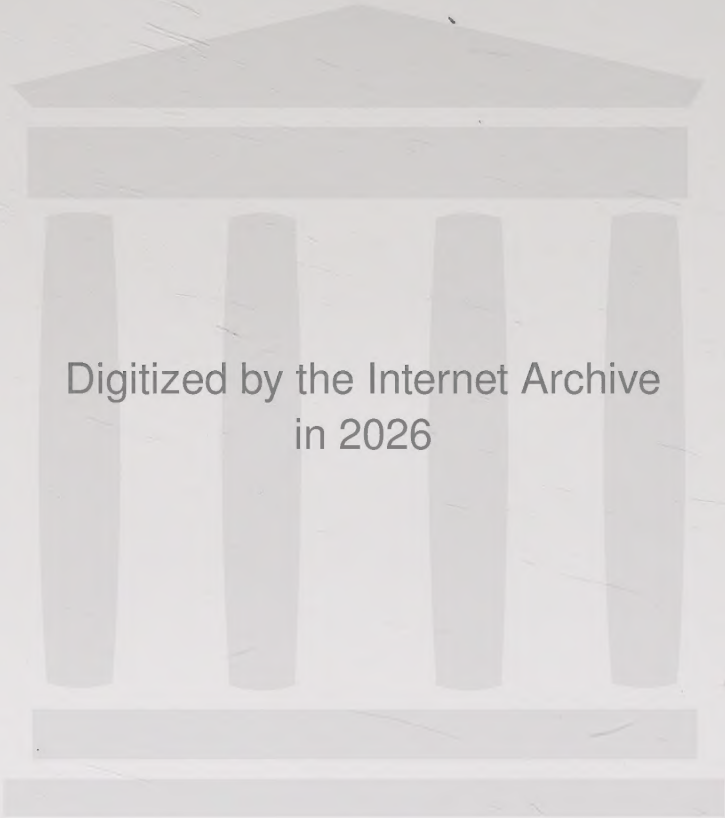
SYNTHESE WASSERLÖSLICHER CYCLOHEXAPEPTIDE ALS MODELLSUBSTANZEN ZUM STUDIUM DER HYDROPHOBEN WECHSELWIRKUNG

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Wolfgang Opitz
aus Samter

Göttingen 1973


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534919_0069

SYNTHESE WASSERLÖSLICHER CYCLOHEXAPEPTIDE ALS MODELLSUBSTANZEN ZUM STUDIUM DER HYDROPHOBEN WECHSELWIRKUNG

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Wolfgang Opitz
aus Samter

Göttingen 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent : Prof. Dr. Dr.e.h. H.Brockmann

Korreferent : Prof. Dr. W.Lüttke

Tag der mündlichen Prüfung : 10.5.73

Die vorliegende Arbeit wurde im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen in der Zeit vom Januar 1970 bis Januar 1973 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr.e.h. H.Brockmann durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Prof. Dr. Dr.e.h. H.Brockmann,
danke ich für die interessante Aufgabenstellung und für die großzügige Förderung meiner Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung und Aufgabenstellung	1
II. Zur Synthese der N^{γ}-Benzyloxycarbonyl-L-α,γ-diaminobuttersäure (8)	17
III. Die Synthese der Cyclohexapeptide	21
1. Darstellung des Cyclo-[glycyl-L-α,γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (3)	21
2. Darstellung des Cyclo-[glycyl-L-α,γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-α,γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (4)	35
IV. Darstellung der Actinocinyl-bis-cyclohexapeptide	48
V. Versuche zum Nachweis der hydrophoben Wechselwirkung	53
VI. Untersuchungen zur Ermittlung der Konformation der Cyclohexapeptide	58
VII. Zusammenfassung der Ergebnisse	66
VIII. Beschreibung der Versuche	68
1. Allgemeines	68
2. Darstellung von Aminosäurederivaten	70

Seite

3. Darstellung des Cyclo-[glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (3) 75

4. Darstellung des Cyclo-[glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (4) 90

5. Darstellung des Cyclo-[glycyl-N$^{\gamma}$-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (60a) 97

6. Darstellung der Actinocinyl-bis-cyclohexapeptide 102

7. Hydrierung mit Ameisensäure als Wasserstoffdonator 105

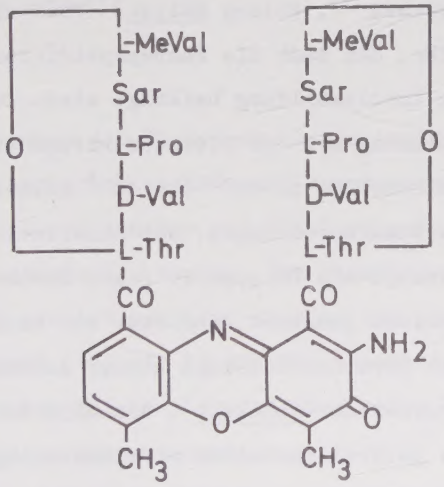
IX. Literaturverzeichnis 109

I. Einleitung und Aufgabenstellung

Das erste Antibiotikum, das man als kristallisierte Verbindung aus Mikroorganismen gewinnen konnte, war das 1940 von Waksman und Woodruff[1] entdeckte Actinomycin A. Inzwischen sind etwa 30 weitere native Vertreter der Actinomycin-Reihe als Stoffwechselprodukte verschiedener Streptomyceten-Kulturen aufgefunden worden.

Aufschluß über die biologischen Gemeinsamkeiten dieser Komponenten verdanken wir Hackmann[2] und Schulte[3], die tumorhemmende Wirkung im Tierversuch bzw. günstigen Einfluß bei Lymphogranulomatose beobachteten. Bedauerlicherweise ist die antibiotische Aktivität jedoch mit hoher Toxität gekoppelt.

Parallelen bezüglich des chemischen Aufbaus der Actinomycine

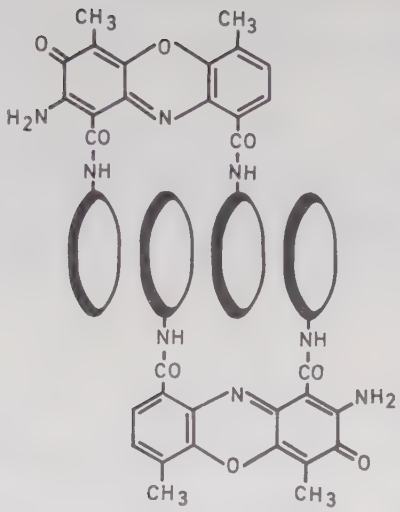


1

wurden deutlich, nachdem Brockmann und Mitarbeitern[4] zunächst die Strukturaufklärung von Actinomycin C_3 und weiterer Actinomycine und später Brockmann und Lackner[5-8] die Totalsynthese der Actinomycine C_1 (1) und C_3 auf verschiedenen Wegen gelang. Danach enthalten alle Actinomycine mit einer Ausnahme[9] als Chromophor das Actinocin, das mit Pentapeptidlactonringen unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung säureamidartig verbunden ist.

Bemerkenswert ist, daß die Wasserlöslichkeit aller Actinomycine einen auffallend großen negativen Temperaturkoeffizienten hat. So erhöht z.B. beim Actinomycin C_3 eine Temperaturerniedrigung von 20° auf 1° die Wasserlöslichkeit um den Faktor 250 [10].

Abgesehen von Versuchen, die für die löslichkeitserhöhende Wirkung von Salzen aromatischer Sulfonsäuren[11,12] auf Actinomycine eine 1:1-Komplexierung des Chromophors wahrscheinlich machen[13], gelang Müller[13] der experimentelle Nachweis dafür, daß auch die Pentapeptidlactonringe der Molekeln zur Komplexbildung befähigt sind. Durch Molekulargewichtsbestimmung mit der Ultrazentrifuge konnte er zeigen, daß Actinomycine in 10^{-5} bis 10^{-3} molaren wäßrigen Lösungen als Dimere vorliegen, bei höheren Konzentrationen dagegen bevorzugt als Oligomere. Diese Erscheinung wird durch die Annahme gedeutet, daß sich bei niedrigen Konzentrationen die Peptidlactonringe zweier Actinomycinmoleküle zu Dimeren verzahnen (Abbild.1), die sich bei höheren Konzentrationen geldrollenähnlich aufeinanderlegen, wodurch schwerlösliche Oligomere entstehen.

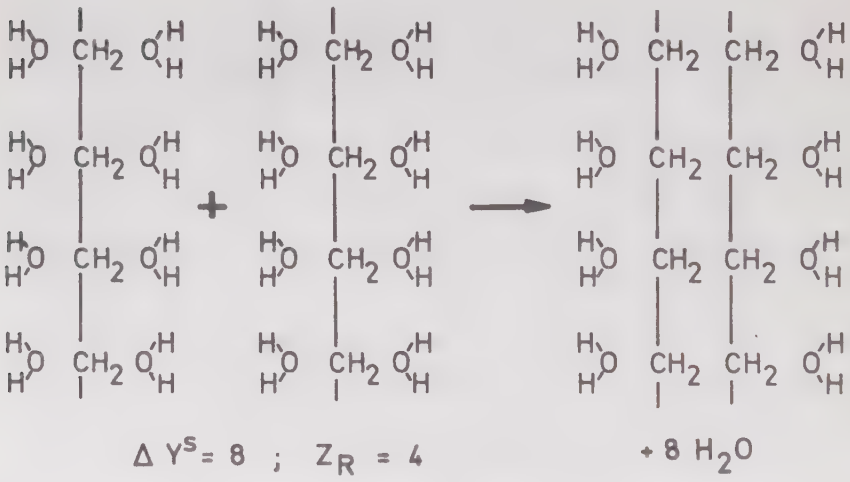


Abbild. 1 : Schematische Darstellung eines Actinomycin - Dimeren

Das Zustandekommen der Bindungen in den erwähnten Komplexen zwischen Actinomycinchromophor und aromatischen Sulfonsäuren läßt sich durch Annahme von EDA-Komplexierung mit hydrophoben Bindungsanteilen deuten. Die Dimerisierung und Oligomerisierung der Actinomycine dagegen ist nur verständlich, wenn man annimmt, daß sie in der Hauptsache durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen den aliphatischen Resten der Peptidlactonringe zustandekommt.

Als hydrophobe Wechselwirkung bezeichnet man das Phänomen, daß sich unpolare, hydrophobe Gruppen (z.B. Alkylreste)

wasserlöslicher Verbindungen in Wasser aneinanderlagern und durch mehr oder weniger lockere Bindungen zusammengehalten werden, im Gegensatz zu anderen Solvenzien, in denen derartige Bindungen nicht beobachtet werden. Hydrophobe Wechselwirkung ist verantwortlich für das Verhalten von Seifenlösungen (Micellbildung), die Dimerisierung langkettiger Carbonsäuren in Wasser und nicht zuletzt für die Stabilität der Tertiärstruktur von Proteinen.



Abbild. 2 : Entstehung einer hydrophoben Bindung zwischen zwei in Wasser befindlichen Alkylresten. Gezeichnet nur die Wassermoleküle der ersten Schale.

Nach Némethy und Scheraga[14] ist für das Auftreten hydrophober Bindungen die Struktur des Wassers verantwortlich und damit ein Entropie-Effekt, der kurz erläutert werden soll.

Bedingt durch van der Waals'sche Kräfte, umgibt sich eine Kohlenwasserstoffkette beim Einbringen in Wasser mit einer monomolekularen Schicht von Wassermolekülen, die ihrerseits durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden. Die Wassermoleküle dieser Schale sind zugleich Bestandteile eines "clusters" aus Wassermolekülen, der sich bei kleinen unpolaren Gruppen um die erste Schale herum anordnet. Bei größeren unpolaren Gruppen ist diese zweite Schale in zwei oder mehere "cluster" unterteilt, die durch Schichten "freier" Wassermoleküle getrennt sind. Diese Wasserschalen sind keine starren Gebilde, sie haben keine feste Größe oder Gestalt, weil sich Wasserstoffbrücken ständig bilden und lösen. Dabei ist bemerkenswert, daß die Bildungsenthalpien sowohl für die Wasserstoffbrücken als auch für die Kohlenwasserstoff-Wasser-Kontakte negativ sind, das Lösen eines Kohlenwasserstoffes in Wasser also ein exothermer Vorgang ist. Da die Hydratation jedoch einen hohen Entropieverlust für das System bedeutet, ist die freie Energie der Auflösung insgesamt positiv.

Die Entstehung einer hydrophoben Bindung zwischen zwei unpolaren Gruppen, z.B. den beiden Alkylresten der Abbild. 2, kann man sich, thermodynamisch gesehen, in drei separate Schritte zerlegt denken:

1. Ablösung eines Teiles der Wasserhülle von jedem der

beiden Alkylreste, damit die CH_2-Gruppen der beiden Reste paarweise in zwischenmolekulare Wechselwirkung treten können, ohne daß bei dieser Ablösung die "Ordnung" der abgelösten Wasserhüllenteile verändert wird. Die freie Energie einer derartigen Ablösung ist positiv und gleich dem Produkt aus der Anzahl ΔY^s der von beiden Resten abgelösten Wassermoleküle (ΔY^s ist gleich der Gesamtzahl der CH_2-Gruppen, die in beiden Ketten freigelegt werden) und der freien Energie E_{RW} für die Ablösung von einem Wassermolekül, also $\Delta Y^s \cdot E_{RW}$.

2. "Schmelzen" der abgelösten Wasserschalenteile, d.h. Übergang ihrer Wassermoleküle von einem geordneten Zustand in einen weniger geordneten, ein Vorgang, dessen freie Energie dank des großen positiven Entropieanteils negativ ist und $\Delta Y^s \cdot \Delta G^o_W$ beträgt.

3. Paarweise Bindung der CH_2-Gruppen beider Reste durch van der Waals'sche Kräfte, ein Vorgang, dessen freie Energie negativ ist. In Abhängigkeit von der Zahl Z_R der entstehenden C-C-Paare errechnet sie sich zu $Z_R \cdot E_R$, wenn E_R die freie Energie der Wechselwirkung eines solchen Paares ist.

Summation der freien Energien aller Einzelschritte ergibt $\Delta G^o_{H\varphi}$ als freie Energie der Dimerisierung zweier hydrophober Reste:

$$\Delta G^o_{H\varphi} = \Delta Y^s \cdot G^o_W + Z_R \cdot E_R - 0{,}5\, Y^s \cdot E_{RW} + \Sigma \Delta G^o_{rot} \qquad (1)$$

Geht man davon aus, daß $\Sigma \Delta G^{o}_{rot}$, die negative freie Energie für die Ausrichtung von Alkylketten in eine für die Aggregation günstige Lage, vernachlässigbar klein ist und setzt man die in Tab.1 gegebenen Parameter ein, so vereinfacht sich die Némethy-Scheraga-Gleichung unter der Voraussetzung $Z_R \approx \Delta Y^S$ zu:

$\Delta G^{o}_{H\varphi} = \Delta Y^S \cdot (-0.167)$ kcal/Mol für aliphatische Verbindungen (2)

und, da man analoge Überlegungen auch für aromatische Verbindungen anstellen kann, zu:

$\Delta G^{o}_{H\varphi} = \Delta Y^S \cdot (-0.136)$ kcal/Mol für aromatische Verbindungen (3)

Hydrophobe Gruppe	Freie Energie in kcal/Mol, 25°C		
	ΔG^{o}_{W}	E_R	$0.5\ E_{RW}$
Aliphatisch	-0.123	-0.15	-0.031
Aromatisch	-0.046	-0.50	-0.16

Tab. 1: Thermodynamische Parameter der Némethy-Scheraga-Gleichung[15)]

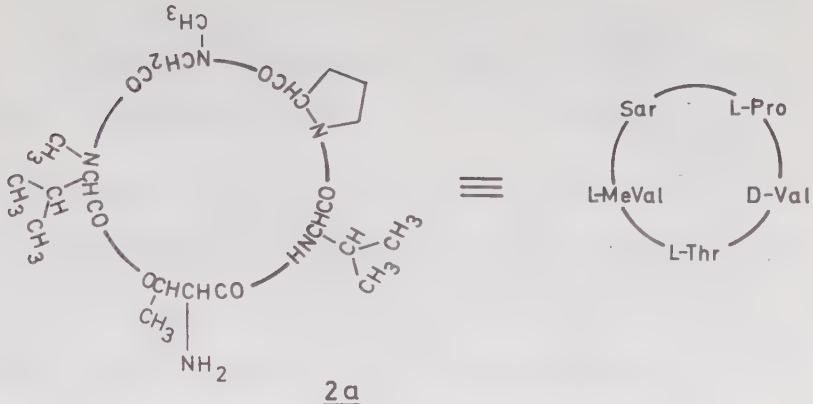
Hydrophobe Wechselwirkung ist also ein Phänomen, das ausschließlich auf den Entropiegewinn zurückzuführen ist , der dadurch erzielt wird, daß bei der Dimerisierung eines Monomeren die Zahl der geordneten Wassermoleküle kleiner wird. Das bedeutet, daß diese Bindungen mit steigender Temperatur fester werden müssen und sich gegebenenfalls, wie im Zusammenhang mit den Actinomycinen besprochen, in einem negativen Temperaturkoeffizienten der Wasserlöslichkeit zu erkennen geben können.

Die Dimerisierung und Oligomerisierung der Actinomycine zeigt, daß sich zwischen den Peptidlactonringen relativ feste hydrophobe Bindungen ausbilden können.

Die Besonderheit der Bindungspartner liegt hier in folgendem:

1. An der Bindung der beiden Partner sind mehere hydrophobe Gruppen (zwei Isopropyl-, eine Methyl- und eine Trimethylen-Gruppe) beteiligt, die nach einem bestimmten Muster an einem verhältnismäßig starren Ring so angeordnet sind, daß zwischen ihnen alternierend fünf hydrophile Gruppen (eine -CO-NH-, eine -CO-O- Gruppe, drei -CO-NR- Gruppen) stehen.
2. Die beiden Partner der hydrophoben Bindung haben am Ringsystem des Chromophors eine Stellung, die eine Dimerisierung von zwei Actinomycinmolekülen durch Verzahnung und damit über vier Peptidlactonringe ermöglicht. Die Verzahnung verstärkt demnach die Bindung der beiden Monomeren. Daß hydrophobe Bindung der Peptidringe auch ohne Verzahnung möglich ist, zeigt die bei höheren Konzentrationen auftretende Oligomerisierung der Actinomycine. Danach wäre eine durch hydrophobe Bindung ermöglichte Dimerisierung der Peptidlactonringe

auch dann zu erwarten, wenn sich diese abgelöst vom Chromophor in Wasser befinden würden. Die Dimerisierungskonstante wäre dann allerdings kleiner als bei den Actinomycinen, weil hier Verzahnung nicht möglich ist. Bemerkbar würde eine Dimerisierung demnach beim freien Peptidlacton (etwa in Form von 2a) erst bei höherer Konzentration, d.h. nur dann, wenn die Löslichkeit relativ groß ist.



2a

2b : $-NH_3^{\oplus}\,Cl^{\ominus}$ statt $-NH_2$

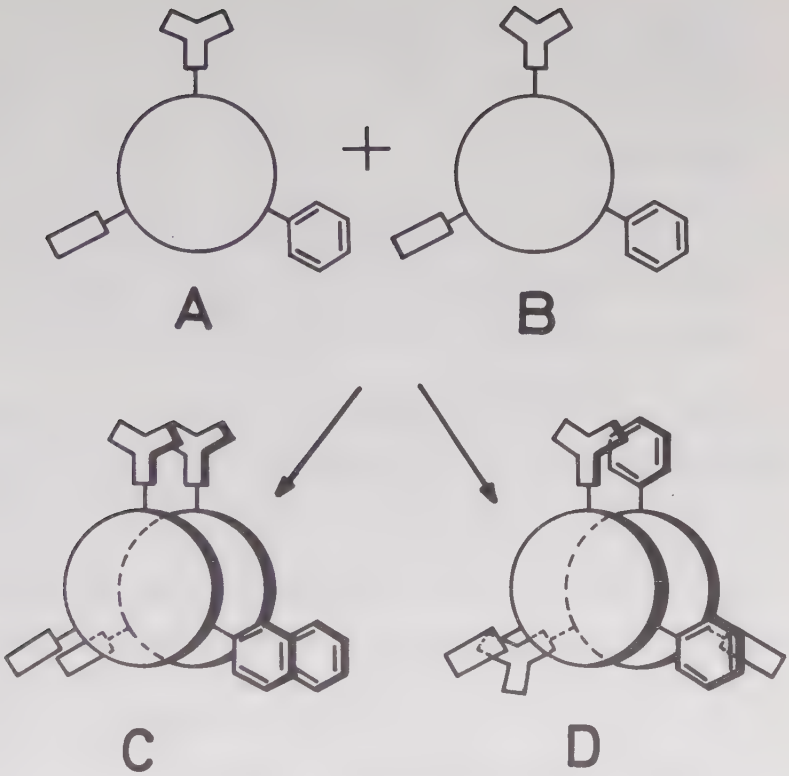
Die Wasserlöslichkeit eines Cyclopentapeptides wie 2a ist nach allem, was über die Löslichkeit ähnlich strukturierter cyclischer Peptide bekannt ist, sicherlich gering, würde sich aber durch Überführung in das Hydrochlorid 2b zweifellos erheblich vergrößern lassen; ob soweit, daß Konzentrationen erreicht werden, bei denen die Dimerisierung bemerkbar

wird, bleibt offen.

Diese Betrachtungen machen deutlich, daß das Ausmaß der durch hydrophobe Bindungen verursachten Assoziation zweier Moleküle oder Molekülteile nahezu ausschließlich davon abhängt,wie groß die Zahl der Kontaktmöglichkeiten zwischen den Partnern ist, denn im Falle der Actinomycine und der in ihnen enthaltenen Peptidlactonringe spielen Wasserstoffbrücken nur eine untergeordnete Rolle. Zum Studium der hydrophoben Wechselwirkung sind demnach Substanzen erforderlich, die auf einem starren Träger möglichst viele unpolare Gruppen so angeordnet enthalten, daß die Moleküle insgesamt deckungsgleiche hydrophobe Muster ergeben. In Abbild. 3 sind solche Modelle und ihre Dimerisierung schematisch dargestellt.

Die Wahrscheinlichkeit, daß zwei identische Moleküle A und B zu Dimeren wie etwa D assoziieren, ist gering, denn die thermodynamisch günstigste Anordnung ist zweifellos dann gegeben, wenn die Zahl der gebildeten C-C-Kontakte gleich der der maximal möglichen ist, d.h. wenn die beiden hydrophoben Muster wie in C wirklich miteinander zur Deckung gebracht sind. Das Beispiel der Actinomycine, in denen die Pentapeptidlactonringe als hydrophobe Muster durch Bindung an den Chromophor bereits vororientiert sind, zeigt, daß man mit meßbaren Effekten rechnen kann, wenn sich Deckungsgleichheit der unpolaren Gruppen als nahezu ausschließliche Einstellmöglichkeit ergibt.

Bedauerlicherweise gibt es keine Möglichkeit, hydrophobe Wechselwirkung direkt nachzuweisen, und indirekte Methoden,



Abbild. 3: Schematische Darstellung der Dimerisierung identischer, deckungsgleicher hydrophober Muster A und B (große Kreise = starre Träger, -□, -⋋, -⬡ = unpolare Gruppen) zu Dimeren C bzw. D.

wie die Molekulargewichtsbestimmung mit der Ultrazentrifuge und dem Osmometer oder die Bestimmung der Oberflächenspan-

nung, sind nur dann anwendbar, wenn die zur Untersuchung gelangenden Substanzen hinreichend wasserlöslich sind. Verbindungen, die zum Nachweis der hydrophoben Wechselwirkung dienen sollen, müssen demnach hydrophobe Muster mit ausreichender Wasserlöslichkeit sein, damit die genannten Meßmethoden Anwendung finden können. Überlagerung anderer Effekte, wie EDA-Komplexierung oder Wasserstoffbrückenbindung, sollte nach Möglichkeit ausgeschlossen, zumindest aber kalkulierbar sein, damit sich hydrophobe Beziehungen nicht der Nachweisbarkeit entziehen können.

Nach unseren Vorstellungen sollte ein Peptidring, aus präparativen Gründen war an ein cyclisches Hexapeptid gedacht, die Forderung nach einem starren Träger für hydrophobe Gruppen gut erfüllen. Die im Verlauf der Synthese einzuführenden unpolaren Gruppen sollten dann durch hydrophobe Wechselwirkung zur Assoziation befähigt sein. Der Einbau einer löslichkeitserhöhenden freien Aminogruppe sollte darüberhinaus die Möglichkeit zur Salzbildung bzw. Quaternierung und Überführung in ein Actinocinylderivat bieten.

Bei der Wahl der Sequenz des Cyclohexapeptides ging ich von folgender Modellvorstellung aus:

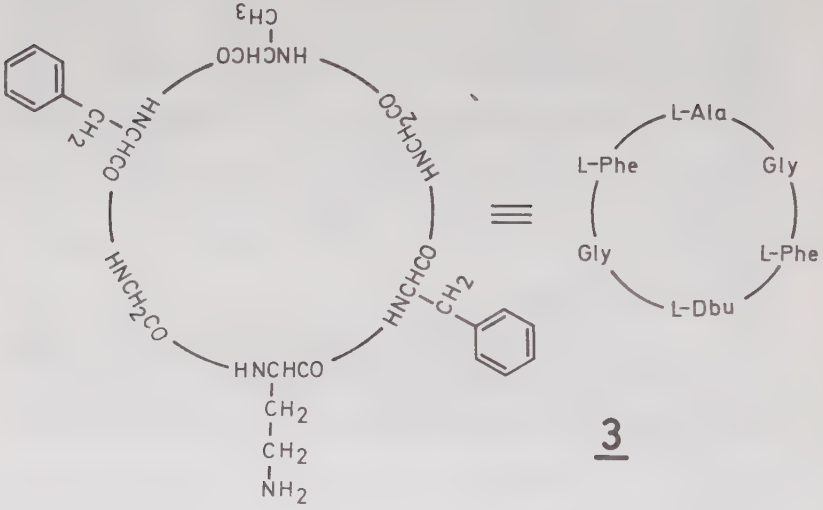
Tanford[16] ermittelte den hydrophoben Bindungsanteil in Assoziaten von Polyaminosäuren mit unpolaren Seitenketten, indem er die gemessenen freien Energien der Assoziation dieser Peptide um den für Polyglycin gültigen Wert verringerte. Eine direkte Übertragung dieser Methode auf unser Problem, also die Bestimmung der freien Energien der Dimerisierung synthetischer Cyclohexapeptide mit hydrophoben

Gruppen und Subtraktion eines Standardwertes, war nicht möglich, da bereits Cyclohexaglycyl[17], als denkbare Bezugssubstanz, in Wasser fast unlöslich ist. Substitution eines Glycinmoleküls im Ring gegen eine Diaminosäure mit möglichst kleinem hydrophoben Rest sollte dagegen einen geeigneten, d.h. genügend wasserlöslichen Grundkörper liefern. Stufenweiser Austausch der restlichen Glycinmoleküle gegen Aminosäuren mit hydrophoben Resten versprach Anwendbarkeit der Tanford-Methode.

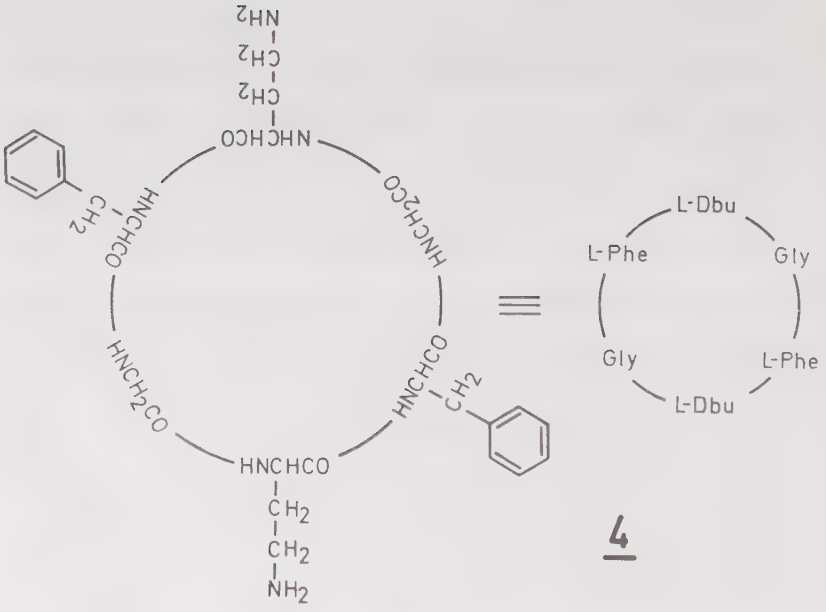
Obwohl ein Vorgehen in dieser Weise sicherlich die aussagekräftigsten Ergebnisse erbracht hätte, entschlossen wir uns, das Programm einzuschränken und das Problem gewissermaßen in der Mitte anzugehen, da wir weder die möglicherweise auftauchenden präparativen Schwierigkeiten erahnen, noch sicher sein konnten, daß unsere Annahme bezüglich des Löslichkeitsverhaltens richtig war. Es erschien uns als erfolgversprechender Kompromiß, eine Sequenzänderung an dem von Zellerhoff[18] synthetisierten Cyclo-[glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] vorzunehmen, da dieses mit einer Cyclisierungsausbeute von 73% erhalten worden und in Wasser völlig unlöslich war. Austausch zuerst eines und schließlich beider Alaninmoleküle sollte bei vertretbaren Ringschlußausbeuten zu den ausreichend wasserlöslichen Cyclopeptiden 3 bzw. 4 führen.

L-$\alpha.\gamma$-Diaminobuttersäure wurde gewählt, da sie von allen leicht zugänglichen Diaminosäuren den kleinsten unpolaren Kohlenwasserstoffrest hat und weil sie bei Umsetzung der Peptide 3 und 4 zu den entsprechenden Actinocynylderivaten

eine optimal enge Bindung der Ringsysteme an den Chromophor ermöglichen sollte.

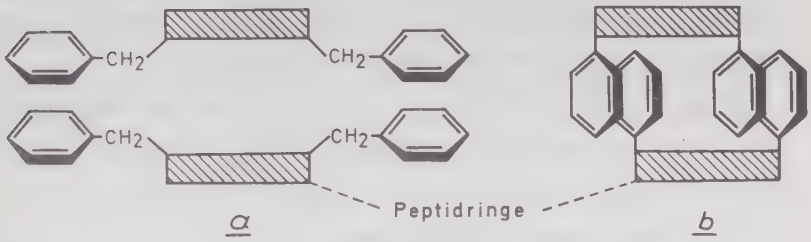


3



4

Betrachtung der Kalottenmodelle beider Substanzen macht hydrophobe Bindungen zwischen zwei gleichen Molekülen nur dann wahrscheinlich, wenn zwei Phenylalaninseitenketten jeweils paarweise dimerisieren. Versuche, in diesem Sinne unterschiedliche Konformationen einzustellen, lassen neben einer Vielzahl minder wahrscheinlicher zwei besonders günstig erscheinende Strukturen erkennen:



Abbild. 4: a flaches und b gewinkeltes Assoziationsmodell der Cyclohexapeptide 3 und 4.

1. flaches Modell (a): fast ebener Peptidringe mit zwei intramolekularen Wasserstoffbrücken zwischen beiden Glycineinheiten und parallel zur Ringebene versetzten Benzylresten, die zur Wechselwirkung mit einem zweiten Molekül befähigt sind.

2. gewinkeltes Modell (b): fast ebener Peptidring mit zwei intramolekularen Wasserstoffbrücken zwischen beiden Glycineinheiten und senkrecht zur Ringebene gedrehten Phenylresten, die zur Wechselwirkung mit einem zweiten Molekül befähigt sind.

Damit sind im Falle des flachen Modelles (a) in jedem Dimeren 12 aromatische und 2 aliphatische Kontaktpaare möglich. Durch Einsetzen der entsprechenden Werte für ΔY^{s} in die vereinfachten Némethy-Scheraga-Gleichungen (2) und (3) errechnet sich die freie Energie der hydrophoben Wechselwirkung zu $\Delta G^{o}_{H\varphi} = -3.95$ kcal/Mol, d.h. mit $\Delta G^{o}_{H\varphi} = -RT\ln K$ ist die Dimerisierungskonstante bei 25°C $K=7.23\cdot10^{2}$. Bei der für osmometrische Messungen günstigen Konzentration von $3\cdot10^{-2}$ Mol/Liter hat man demnach einen Dimerenanteil von 95.3% zu erwarten. Für das gewinkelte Modell (b) mit 12 aromatischen C-C-Paaren ergibt die analoge Betrachtung:

$\Delta G^{o}_{H\varphi} = -3.27$ kcal/Mol ; $K = 2.33\cdot10^{2}$ und 92% Dimerisierung, d.h. bei den Cyclopeptiden 3 und 4 durfte man hydrophobe Wechselwirkung als meßbaren Effekt erwarten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war:

1. Synthese der Cyclopeptide 3 und 4 als wasserlösliche Modellsubstanzen zum Studium der hydrophoben Wechselwirkung. Außerdem sollte das elektrophoretische Verhalten der cyclischen und linearer Peptide im Hinblick auf die Frage verglichen werden, ob ein Elektropherogramm eine Aussage über die Ringgröße eines Peptidmoleküls gestattet.

2. Löslichkeitsbestimmungen an beiden Cyclopeptiden und orientierende Messungen zum Nachweis der hydrophoben Wechselwirkung.

3. Synthese der entsprechenden Actinocinyl- bis-cyclohexapeptide und ihre Untersuchung auf Löslichkeit und antibiotische Wirksamkeit.

Von der Fixierung der Peptidringe am Chromophor der Actino-

mycine versprachen wir uns eine Vororientierung der Cyclopeptidringe zueinander und damit eine Optimierung des Kontaktes zwischen den hydrophoben Gruppen zweier Ringe. Außerdem interessierten uns solche Actinomycinanaloge, weil bei Substitution der Pentapeptidlactonringe nativer Verbindungen durch größere und zudem ausschließlich Peptidbindungen enthaltende Ringe ganz andere Produkteigenschaften denkbar sind. So wurde von Berndt[19], der den Peptidteil des nativen Actinomycins C_3 zum Hexapeptidlacton aufzuweiten versuchte, eine Substanz isoliert, die keine antibiotische Wirksamkeit aufwies.

II. Zur Synthese der N^{γ}-Benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure

Die beiden stereoisomeren $\alpha.\gamma$-Diaminobuttersäuren sind in der Natur ausgesprochen selten. Trotzdem haben in letzter Zeit verschiedene Arbeitsgruppen Peptidsynthesen insbesondere mit dem L-Isomeren dieser Aminosäure durchgeführt. Anlaß zu diesen Versuchen mögen die Untersuchungen an den Verbindungen der Polymyxin-Reihe gewesen sein. Dabei handelt es sich um nahe verwandte, aus Bacillus polymyxa gewonnene[20], basische cyclische Oligopeptide mit antibiotischer Wirksamkeit gegen gramnegative Erreger, die sämtlich L-$\alpha.\gamma$-Diaminobuttersäure enthalten. - Der vermehrte Einsatz der L-$\alpha.\gamma$-Diaminobuttersäure in Synthesen einerseits und die Unmöglichkeit der bei anderen Aminosäuren durch-

führbaren Gewinnung durch Hydrolyse von Naturstoffen andererseits war Veranlassung, nach neuen Wegen zur Synthese dieser Verbindung zu suchen.

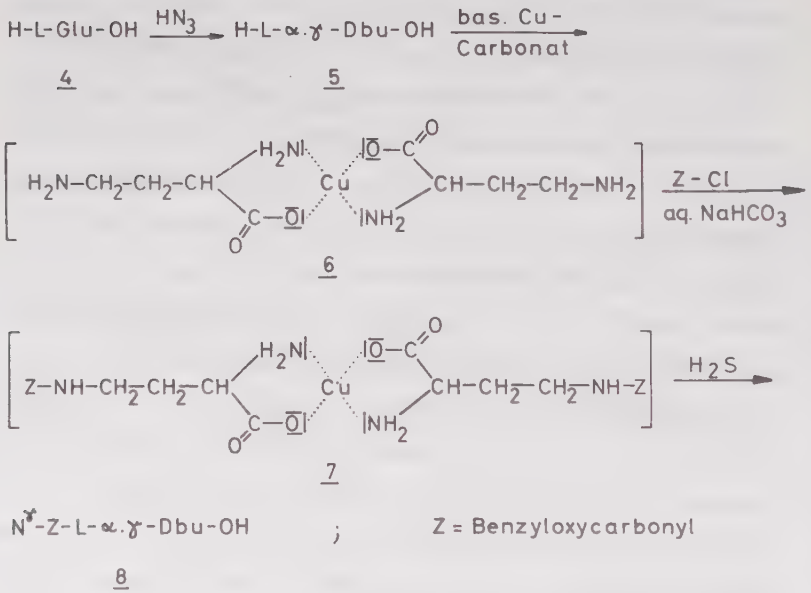
Zuerst wurde die Substanz von Karrer und Mitarbeitern[21] durch Hofmann-Abbau von Acetyl-L-glutamin und nachfolgender Hydrolyse in unbefriedigender Ausbeute dargestellt und als Oxalat isoliert. Die später von Adamson[22] beschriebene Herstellung über den Schmidt-Abbau von L-Glutaminsäure lieferte zwar höhere Ausbeuten, jedoch ist das Abtrennen des Produktes aus der Reaktionslösung über die Salze der Phosphorwolfram-, Oxal- oder Pikrin-Säure recht umständlich. Dieser Nachteil läßt sich vermeiden, wenn man nach Talbot und Mitarbeitern[23] α-Brom-γ-butyrolacton mit Phthalimid zur $\alpha.\gamma$-Diphthalimido-buttersäure umsetzt und anschließend mit Salzsäure hydrolysiert. - Weitere Synthesemöglichkeiten sind in der Umsetzung von Tosyl-L-asparaginmethylester mit Tosylchlorid/Pyridin zu α-Tosylamino-β-cyano-L-propionsäure-methylester, anschließender Esterverseifung, Nitrilhydrierung und Detosylierung[24], sowie im Hofmann-Abbau von Tosyl-L-glutamin[25] und anschließender Detosylierung gegeben.

Alle beschriebenen Methoden haben wenigstens einen Nachteil: schlechte Ausbeute, umständliche Aufarbeitung, erschwerte Beschaffung des Ausgangsmaterials, vielstufige und damit ausbeuteerniedrigende Synthese oder unbequeme Schutzgruppenabspaltung. Es erschien mir deshalb lohnend, ein Verfahren ohne solche Mängel zu finden, wobei ich hoffte, am schnellsten über den Hofmann-Abbau von N-geschütztem L-Glutamin[21,25]

zum Ziel zu gelangen. Weder die Verwendung von Tosyl-L-glutamin noch von Formyl-L-glutamin führte jedoch zum Erfolg: im ersten Falle mißlang die Detosylierung der N-α - Tosyl-L- α.γ -diaminobuttersäure mit 30 proz. Bromwasserstoffsäure in Gegenwart von Phenol[26], denn das Umsetzungsprodukt war dünnschichtchromatographisch uneinheitlich und nicht identisch mit authentischer L- α.γ -Diaminobutter - säure, im zweiten ergab die Deformylierung des rohen Abbauproduktes lediglich braune Schmieren. Die besten Ergebnisse wurden schließlich über den Schmidt-Abbau von L-Glutaminsäure in konz. Schwefelsäure mit Natriumazid erzielt. Beim Nacharbeiten der Vorschrift von Adamson[22] und chromatographischer Untersuchung der so erhaltenen Reaktionslösung zeigte sich, daß nur ein kleiner Teil des Ausgangsmaterial umgesetzt war. Nahm man dagegen die Azid-Zugabe sehr viel langsamer und bei Raumtemperatur vor, verringerte sich der Anteil des Substrates wesentlich zugunsten des Produktes. Die Aufarbeitung konnte ebenfalls in zwei Punkten vorteilhaft verändert werden. So fand anstelle des teuren Bariumoxids das billigere Calziumcarbonat zum Abstumpfen der Schwefelsäure Verwendung, was neben der besseren Filtrierbarkeit des Niederschlages gewährleistet , daß der pH-Wert der Lösung niemals zu stark ansteigt. Zur Abtrennung der L- α.γ -Diaminobuttersäure aus dem Filtrat behandelte man dieses mit basischem Kupfer-II-carbonat und setzte die so erhaltene Lösung des Kupferkomplexes der Aminosäure 6 analog der von Vogler und Lanz[27] gegebenen Vorschrift zum Kupfer-Komplex der N^{γ} -Benzyloxycarbonyl-L- α.γ -diaminobuttersäure (7) um.

Aus dem in durchschnittlich 55% Ausbeute erhaltenen Komplex wurde die geschützte Aminosäure 8 durch Einwirkung von Schwefelwasserstoff in Freiheit gesetzt. Sie war frei von Ausgangsmaterial, die physikalischen Konstanten stimmten mit den Literaturwerten[27] überein.

Schema 1: Synthese von N^{γ}-Benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure (8)



III. Die Synthese der Cyclohexapeptide

1. Darstellung des Cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (3)

Der entscheidende Schritt bei der Darstellung eines cyclischen Peptides ist die Ringschlußreaktion, da diese erfahrungsgemäß, gemessen an anderen Synthesestufen, nur geringe Ausbeuten liefert. Eine Gegenüberstellung der in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse solcher Reaktionen läßt mit Einschränkung folgenden Schluß zu: lineare Hexapeptide, die amino- oder carboxy-terminal, am besten aber an beiden Enden, Glycin enthalten, lassen sich mit höheren Ausbeuten cyclisieren als solche, an deren Verknüpfungsstellen Aminosäuren mit voluminösen Resten gebunden sind[28,29,30,31].

Bei der mir vorgegebenen Aminosäuresequenz des Cyclopeptides sind vier Linearpeptide mit terminalem Glycin konstruierbar:

a) H-Gly-L-α.γ-Dbu-L-Phe-Gly-L-Ala-L-Phe-OH

b) H-Gly-L-Ala-L-Phe-Gly-L-α.γ-Dbu-L-Phe-OH

c) H-L-Ala-L-Phe-Gly-L-α.γ-Dbu-L-Phe-Gly-OH

d) H-L-α.γ-Dbu-L-Phe-Gly-L-Ala-L-Phe-Gly-OH

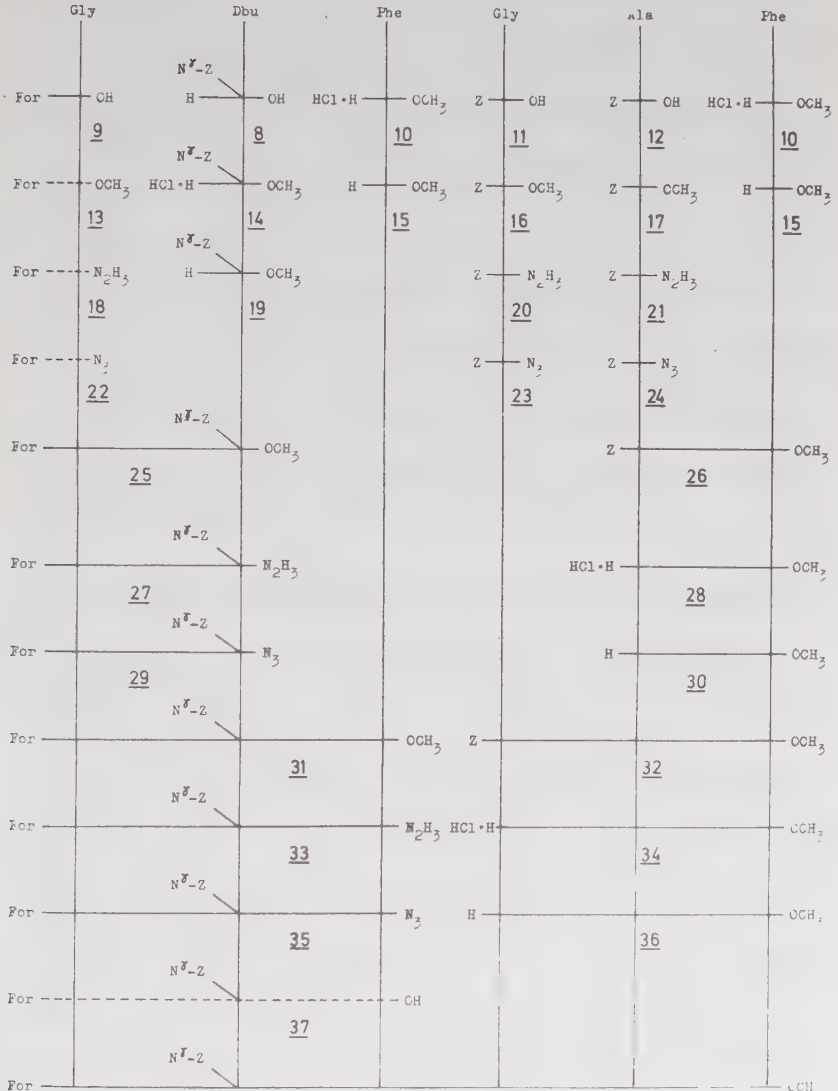
Während nach dem oben gesagten die Sequenz d) mit Sicherheit am ungünstigsten ist, da die in allen vier Fällen bei der Cyclisierung geschützte L-α.γ-Diaminobuttersäure dort als N-terminale, stark raumerfüllende Gruppe vorhanden ist, sollten sich die Peptide a), b) und c) etwa vergleichbar gut cyclisieren lassen. Da die Verbindungen a) und b) den Vorteil boten, daß sie sich aus zwei Tripeptiden aufbauen ließen, von denen das eine, Glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-

methylester, bereits bekannt war[18], habe ich mich letztlich für die Möglichkeit a) entschieden.

Der nächste Schritt nach der Festlegung der Sequenz des Linearpeptides ist üblicherweise die Wahl der aktivierenden oder (und) schützenden Gruppen für das Amino- und das Carboxyl-Ende. Da ich beabsichtigte, den Ringschluß sowohl nach der Azid-[32,33] als auch nach der Carbodiimid-Methode[34] zu versuchen, bot es sich an, die carboxylständige Aminosäure während der Synthese durch Überführung in den Methylester zu schützen. Problematischer war die Blockierung der Aminogruppe des aminoterminalen Glycins, da von der Synthese der N^{γ}-Benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$ diaminobuttersäure her bereits eine Schutzgruppe festgelegt war. Die Aminofunktion des Glycins mußte sich also zur Cyclisierung ohne Anwendung hydrogenolytischer Methoden oder Einwirkung von Brom- oder Jodwasserstoffsäure freisetzen lassen, um zu gewährleisten, daß die N^{γ}-Benzyloxycarbonyl-Gruppe in der L-$\alpha.\gamma$-Diaminobuttersäure erhalten blieb. Diese Forderung erfüllt sehr bequem und nahezu ausschließlich die Formylgruppe[35], die sich leicht mit methanolischer Salzsäure[35,36] unter Erhalt der Benzyloxycarbonyl-Gruppe abspalten läßt. Zur Synthese des gesamten Peptides sollte bei allen Kupplungen nach Möglichkeit die racemisierungsfreie Azid-Methode[32,33] und nur in Ausnahmefällen die Carbodiimid-Methode[34] Anwendung finden.

Schema 2 gibt das aus den Ausgangsüberlegungen resultierende Kupplungsschema wieder. Zwei der aufgeführten Verbindungen wurden auf verschiedenen Wegen erhalten; die Umsetzungen

Schema 2: Synthese des Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylesters (38)



der durch unterbrochene Linien gekennzeichneten Zwischenprodukte verliefen mit unbefriedigenden Ausbeuten.

Formyl-glycin (9) wurde durch Umsetzung von Glycin mit Ameisensäure und Acetanhydrid erhalten[37]. Die Benzyloxycarbonyl-Aminosäuren 11 und 12 stellte man durch Einwirkung von Chlorameisensäure-benzylester auf die Aminosäuren in wäßrigem Alkali bei -10° dar[38,39]. Die Umsetzung der freien und N-geschützten Aminosäuren mit Diazomethan (zu 13, 16 und 17) und mit Chlorsulfinsäure-methylester[40] (zu 10, 14, 16 und 17) führte in hohen Ausbeuten zu den entsprechenden Estern, die sich durch Einwirkung von Hydrazinhydrat in die ausnahmslos gut kristallisierenden Hydrazide überführen ließen. Glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid (34) wurde nach den gegebenen Vorschriften hergestellt[18,41]. Die Ester setzte man vor der Synthese aus den Hydrochloriden durch Zugabe von Triäthylamin in Freiheit.

Die Reaktion von N^{γ}-Benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure-methylester (19) mit Formyl-glycin (9) unter Anwendung von Dicyclohexyl-carbodiimid als Kupplungsreagenz lieferte den Dipeptidester 25 in 83 % Ausbeute als zähes, gelbliches Öl. Obwohl das Produkt mehrfach in Aceton aufgenommen und die Lösung filtriert wurde, um den bei der Reaktion gebildeten Dicyclohexyl-harnstoff zu entfernen, ließ sich dieser so nicht vollständig abtrennen. Da die Kupplung von Formyl-glycin-azid (22) mit 19 jedoch nur 54 % 25 ergab, wandte man bei späteren Versuchen zur Gewinnung von 25 ausschließlich die Carbodiimid-Methode an.

Bei Einwirkung von Hydrazinhydrat auf die methanolische Lösung von 25 schied sich bereits nach kurzer Zeit Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure-hydrazid (27) in feinen Nadeln ab, die sich zu kugeligen Kristalldrusen vereinigten, bis schließlich das gesamte Reaktionsgemisch erstarrte. Die außerordentlich geringe Löslichkeit von 27 in den üblichen organischen Lösungsmitteln war für die weiteren Präparationen recht nachteilig, andererseits gewährleistete sie die Abtrennung letzter Harnstoffspuren, die aus dem Ausgangsester 25 stammten.
Die weitere Umsetzung des Dipeptidhydrazids 27 zum Azid 29 und dessen Kupplung mit L-Phenylalanin-methylester 15 verlief unproblematisch, wenn man davon absieht, daß 29 sich schlecht aus der wäßrigen Lösung extrahieren ließ. Das Reaktionsprodukt 31 fiel nahezu quantitativ als flockiger Niederschlag aus dem Ansatz aus, sodaß auf die Aufarbeitung der Mutterlauge verzichtet werden konnte. Eine kleine Menge 31 wurde aus Methanol zur Analyse umgefällt, für eine Reinigung im präparativen Maßstab kommen allerdings nur Lösungsmittelsysteme wie Dimethylformamid/Wasser oder Dimethylsulfoxid/Wasser in Betracht.
Wegen der Schwerlöslichkeit von 31 erschien es ungünstig, den Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester(38) durch Azidkupplung von Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-azid (35) mit dem Tripeptid Glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester (36) darzustellen, da nicht auszuschließen war, daß das Azid ebenso

schlecht extrahierbar sein würde wie 29. Deshalb wurde der Tripeptidester 31 verseift und die freie Säure 37 mit 36 nach der Carbodiimid-Methode umgesetzt. Das Aufarbeiten des Ansatzes in der üblichen Weise erwies sich als unmöglich, denn beim Waschen der Reaktionslösung fiel Dicyclohexyl-harnstoff in Mengen an, die keine einwandfreie Phasentrennung ermöglichten. Darüber hinaus fiel beim Trocknen der Lösung mit Natriumsulfat das gesamte Produkt aus, wurde am Trockenmittel adsorbiert und mußte durch Auswaschen mit Wasser von diesem abgetrennt werden. Fällen von 38 aus der Reaktionslösung mit Äther und wiederholtes Umfällen aus Dimethylformamid/Äther bedeutete zwar eine Umgehung dieser Schwierigkeiten, ging aber zu Lasten der Ausbeute, die dann mit 50 % relativ niedrig lag.

Einige neuere Veröffentlichungen beschreiben Synthesen, bei bei denen durch Diazotierung von Hydraziden in Dimethylformamid-haltigen Mischungen[42,43] Azide zur Darstellung sowohl linearer[42] als auch cyclischer Peptide[43] gewonnen wurden. Außerdem ist praktisch bei keiner Azid-Cyclisierung eine Extraktion des Diazotierungsproduktes vorgenommen worden. Etwaige Einwände, die zur Diazotierung zugesetzte Essigsäure könne auch nach Neutralisation durch Hydrolyse der Salze den Reaktionsablauf stören, wurden sowohl durch präparative Befunde[43] als auch durch kinetische Messungen entkräftet, die aussagen, daß Essigsäure die Bildung der Peptidbindung katalysiert[44]. Damit erschien die Darstellung des Formyl-hexapeptid-methylesters 38 durch Azid-Kupplung von 35 mit 36 erfolgversprechend. Nach Durchführung der

Reaktion im "Eintopf-Verfahren" konnte das Produkt 38 als stark gequollener Niederschlag mit Wasser gefällt werden. Die Ausbeute war mit 77 % etwa um die Hälfte höher als bei der Carbodiimid-Kupplung, die Reinheit, nach Drehwert und Schmelzpunkt zu urteilen, ebenfalls besser.

Um den Formyl-hexapeptid-methylester 38 in eine mit Carbodiimid cyclisierbare Verbindung zu überführen, wurde er zunächst durch alkalische Verseifung zur freien Säure 39 umgesetzt, die ich dann in Suspension in n methanolischer Salzsäure zu 42 zu deformylieren versuchte. Das so erhaltene Produkt war ninhydrinpositiv, die Elementaranalyse ergab in guter Übereinstimmung die für die freie Säure berechneten Werte :

$C_{37}H_{46}N_7O_9Cl$ (768.3)	Ber.	C	57.84	H	6.05	N 12.78
	Gef.	C	57.66	H	6.12	N 12.72

Da das NMR-Spektrum in Hexadeutero-Dimethylsulfoxid bei δ = 3.57 ppm, d.h. in einem Bereich, in dem die meisten Methylen-Gruppen der Aminosäuren Signale verursachen, ein Singulett mit einer Intensität zeigte, die etwas weniger als zwei Protonen entsprach und demnach offenbar die freie Säure vorlag, versuchte ich, eine Probe der Substanz in der von Wieland und Ohly[45] angegebenen Weise in wäßrigem Methanol mit Dicyclohexyl-carbodiimid zu cyclisieren. Bei Aufarbeitung des Ansatzes wurde ein Präparat erhalten, das nach den Ergebnissen der Elementaranalyse der Ester des Linearpeptides sein sollte. Damit lag die Vermutung nahe, daß das in Lösung befindliche Carbodiimid nicht den Ringschluß, sondern lediglich die Veresterung der freien Carb-

oxyl-Gruppe verursacht hatte. Diese Annahme ließ sich jedoch sowohl NMR-spektroskopisch widerlegen, denn die Spektren von Ausgangs-und Reaktionsprodukt waren nahezu deckungsgleich, als auch durch das Verhalten beider bei der Elektrophorese, denn beide Substanzen wanderten nicht im basischen Puffersystem. Die Wiederholung der Elementaranalyse derselben Verbindung ergab diesmal Werte, die auf das Hexapeptid-methylester-hydrochlorid 40 zutrafen :

$C_{38}H_{48}N_7O_9Cl$ (782.3)

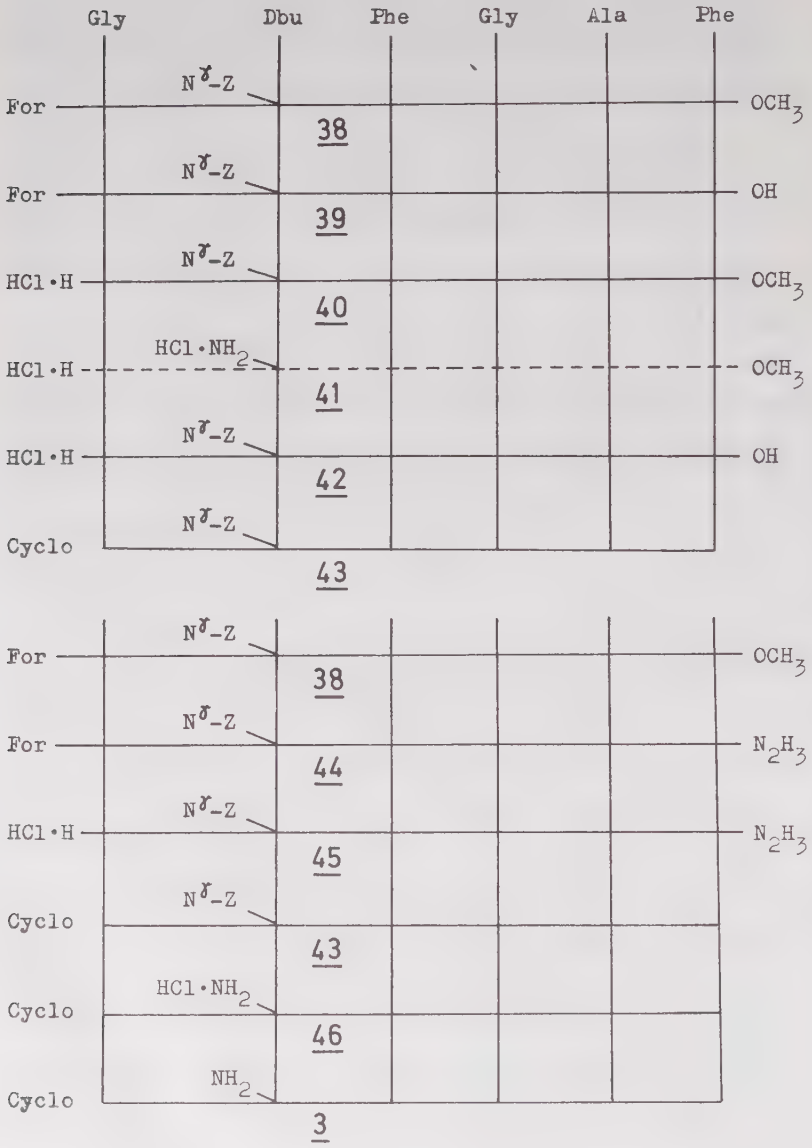
Ber.	C	58.34	H	6.18	N	12.52	Cl	4.53	OCH_3 3.97
Gef.	C	58.45	H	6.18	N	12.54	Cl	4.53	OCH_3 3.74

Damit war bewiesen, daß bei Deformylierung des Formylhexapeptides 38 in einer Suspension von methanolischer Salzsäure gleichzeitig die freie Carboxyl-Gruppe mit 95 % Ausbeute, also nahezu quantitativ, verestert wurde. Ähnliches beobachteten Waley und Watson[46], als sie bei der Behandlung von Formyl-L-acetyl-tyrosyl-L-benzyloxycarbonyllysin mit absolutem Benzylalkohol/Acetylchlorid L-Tyrosyl-L-benzyloxycarbonyl-lysin-benzylester in guter Ausbeute erhielten.

Als nächstes versuchte ich, das ungeschützte lineare Hexapeptid 42 durch Deformylierung von 38 mit Wasserstoffperoxid[47] darzustellen. Selbst bei Anwendung sehr großer Reagenzmengen konnte lediglich Ausgangsmaterial zurückgewonnen werden. Von dem von Geiger und Siedel[48] beschriebenen Verfahren zur Abspaltung der Formyl-Gruppe mit Hydrazinacetat wollte ich keinen Gebrauch machen, denn da das Löslichkeitsverhalten von 42 unbekannt war, konnten sich Trennprobleme

ergeben. Die Methode der hydrogenolytischen Deformylierung in mit Salzsäure gesättigtem Tetrahydrofuran[49] schied aus, da 38 zu wenig löslich war und weil die Benzyloxycarbonyl-Gruppe der L-α,γ-Diaminobuttersäure intakt bleiben mußte. Abgesehen davon, muß der Wert der beschriebenen Reaktion aus zwei Gründen bezweifelt werden : a) seit 1951 ist bekannt, daß die Formyl-Gruppe ausgesprochen säurelabil ist[50]; b) eigene und die von Hofmann und Mitarbeitern[51] durchgeführten Versuche zeigten, daß diese Schutzgruppe stabil gegenüber katalytisch angeregtem Wasserstoff ist.
Alkalische Verseifung des Esters 40 lieferte schließlich das ungeschützte Linearpeptid 42, das sich mit Dicyclohexylcarbodiimid in wäßrigem Dimethylformamid cyclisieren ließ. Das Dicyclohexyl-harnstoff enthaltende Rohprodukt schlämmte man in Chloroform auf, gab den Brei auf eine kurze Säule aus neutralem Aluminiumoxid und eluierte zuerst den Harnstoff mit Chloroform und anschließend das Cyclopeptid 43 mit Dimethylformamid in 35 % Ausbeute.
Die geringe Ausbeute, insbesondere aber die umständliche und letztlich doch unbefriedigende Reinigungsoperation, die letzte Harnstoffmengen nicht abtrennte, waren die Begründung für Versuche, das Cyclopeptid 43 durch Azid-Kupplung zu gewinnen. Dazu wurde das geschützte Linearpeptid 38 zuerst in methanolischer Suspension mit Hydrazinhydrat umgesetz. Offensichtlich erhielt man ein reineres Präparat (Schmelzpunktvergleich), als man 38 in Dimethylsulfoxid löste, mit großem Hydrazinhydrat-Überschuß versetzte (Reagenzüberschuß war hier und bei analogen Problemen notwen-

Schema 3: Synthese des Cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (3)



dig, da Dimethylsulfoxid selbst mit Hydrazin reagiert) und anschließend mit Wasser fällte. Da keines der beiden Hydrazide analysenrein zu erhalten war, setzte man das Rohprodukt mit überschüssiger methanolischer Salzsäure zum Glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-hydrazid-hydrochlorid (45) um. Azid-Kupplung des rohen 45 führte mit 64 % Ausbeute zum geschützten Cyclopeptid 43.

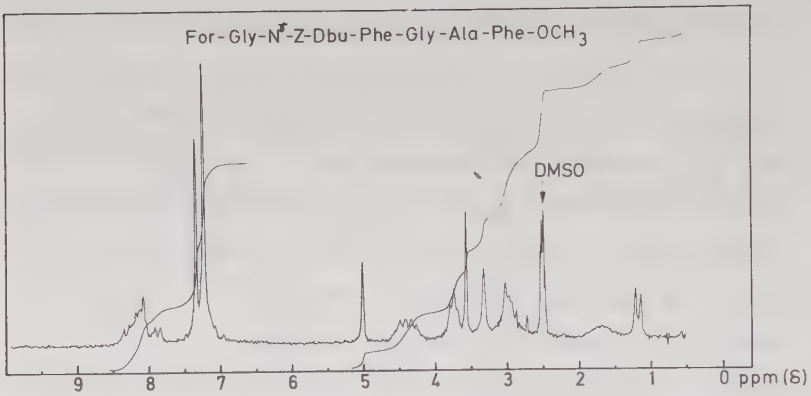
Folgende Argumente sind für die erfolgreiche Cyclisierung beweisend :

a) Das Produkt 43 ergibt mit Ninhydrin keine Farbreaktion.

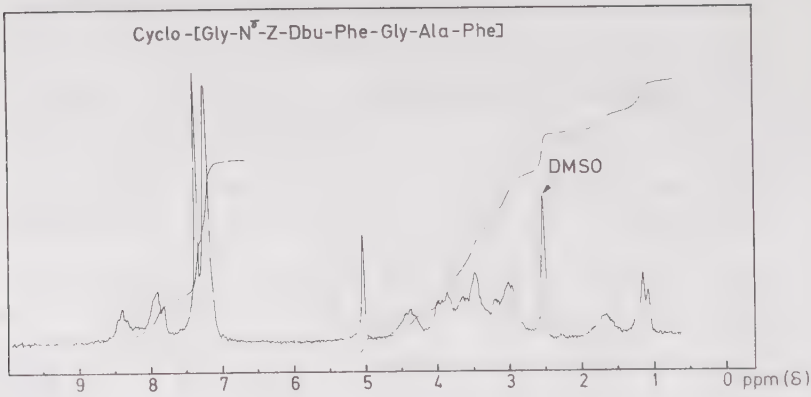
b) 43 schmilzt bei 324-325° und damit wesentlich höher als alle Vorstufen.

c) Mit -89.9° ist die bei c=2 in Dimethylformamid gemessene optische Drehung von 43 erheblich größer als der Drehwert sämtlicher Zwischenprodukte.

d) Beim Vergleich der NMR-Spektren des linearen Formyl-hexapeptid-methylesters 38 und des Cyclopeptides 43 fallen Abweichungen in zwei Bereichen besonders auf. Die Methyl-Gruppe des Alanins in 38 gibt bei δ =1.17 ppm ein gut aufgelöstes Dublett, im Spektrum von 43 beobachtet man dagegen für diese Gruppe lediglich ein breites, kaum strukturiertes Signal zwischen δ =1.0 und 1.3 ppm. Ähnliches gilt für die Signale im Methylen-Bereich. Denn kann man im Spektrum von 38 zwischen δ =2.8 und 3.8 ppm noch drei breite Signale ausmachen (und das Ester-Methoxyl bei δ =3.57 ppm), so erkennt man in dem von 43 zwischen δ =2.75 und 4.05 ppm lediglich einen breiten Bandenhaufen



Abbild. 5: 100 MHz-Spektrum von 38 in Hexadeutero-dimethylsulfoxid

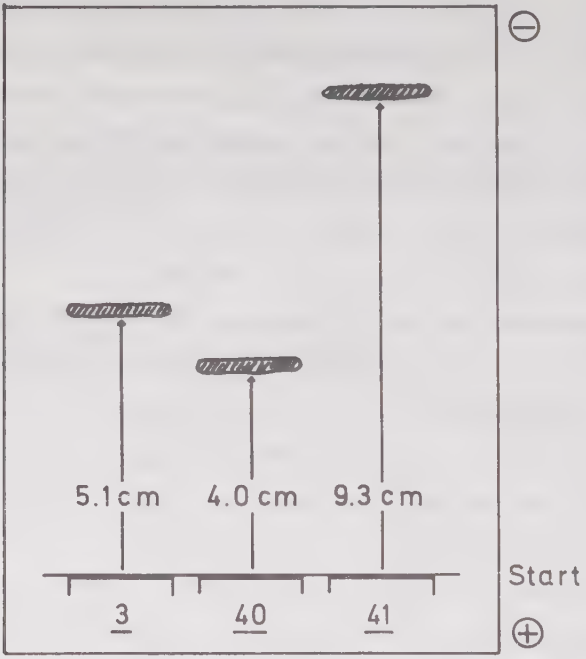


Abbild. 6: 100 MHz-Spektrum von 43 in Hexadeutero-dimethylsulfoxid

mit zwei Maxima. Außerdem macht die beschriebene Unschärfe der Signale deutlich, daß die Substanz nicht in einer Vorzugskonformation sondern als Konformerengemisch vorliegt. Alle angeführten Argumente stützten bislang lediglich die Annahme einer cyclischen Struktur der Verbindung, sagten jedoch nichts darüber aus, ob die cyclisierende Dimerisierung, die bei Tri-, Tetra- und auch bei Penta-Peptiden beobachtet wurde, Neben- oder gar Hauptreaktion gewesen war, oder ob sich lineare Oligopeptide gebildet hatten. Beim Lösen des aus der Azid-Kupplung gewonnenen Rohproduktes blieben zwar sehr geringe Mengen schleimiger und in allen Medien unlöslicher Verunreinigungen zurück, jedoch konnten diese wegen ihrer schlechten Löslichkeit und zu geringer Mengen nicht näher untersucht werden.

Um zu sehen, ob das Molekulargewicht des Cyclisierungsproduktes auf das der Formel paßt oder auf einen n-fach größeren Ring, überführte man 43 durch Hydrierung in das Cyclo-[glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl]-hydrochlorid (46). Dieses erwies sich als leicht löslich in Wasser und Methanol, war aber so hygroskopisch, daß man es für weitere Untersuchungen nicht verwenden konnte. Die aus 46 durch Einwirkung von Ammoniak erhaltene freie Base 2 war zwar nicht hygroskopisch, aber so wenig löslich, daß die osmometrische Molekulargewichtsbestimmung ohne befriedigendes Ergebnis blieb. Auch die Molmassebestimmungen nach Rast in p-Amino-hexahydrobenzoesäure-lactam[52] und kryoskopisch in Dimethylsulfoxid waren erfolglos. Am aussagekräftigsten war der Vergleich der

Wanderungsgeschwindigkeiten der cyclischen Base 3 mit dem Glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid (40)und dem daraus durch katalytische Hydrierung gewonnenen Glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester-dihydrochlorid (41) im Elektropherogramm. Geht man davon aus, daß die Linearpeptide 40 und 41 im Schnitt nicht gestreckt sondern ver-



Abbild. 7: Elektropherogramm der Peptide 3, 40 und 41. Bedingungen : 1000 V/cm, 170 mA, 15 Min., Puffer pH 1.1 (Ameisensäure/Essigsäure/Wasser 15:10:75)

knäult vorliegen, dann sollten alle drei Verbindungen etwa den gleichen Wirkungsquerschnitt haben. Damit sollte man erwarten, daß die Wanderungsgeschwindigkeiten im vorliegenden Falle - unabhängig von der Teilchengröße - nur von der Zahl der Ladungen im Molekül abhängen. Der Versuch bestätigte klar die Struktur von 3 als cyclisches Monomeres : das lineare Di-Kation 41 lief etwa doppelt so schnell wie das lineare Mono-Kation 40 und das cyclische Mono-Kation 3. Aus dem Laufstreckenverhältnis von 3 zu 40 wie 1:0.785 und von 3 zu 41 wie 1:1.86 kann man entnehmen, daß die statistische Faltung der Linearpeptide zu Gebilden führt, deren mittlerer Durchmesser geringfügig größer als der des Cyclopeptides ist, was eine leichte Verringerung der Wanderungsgeschwindigkeit zur Folge hat.

2. Darstellung des Cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (4) und seiner Derivate

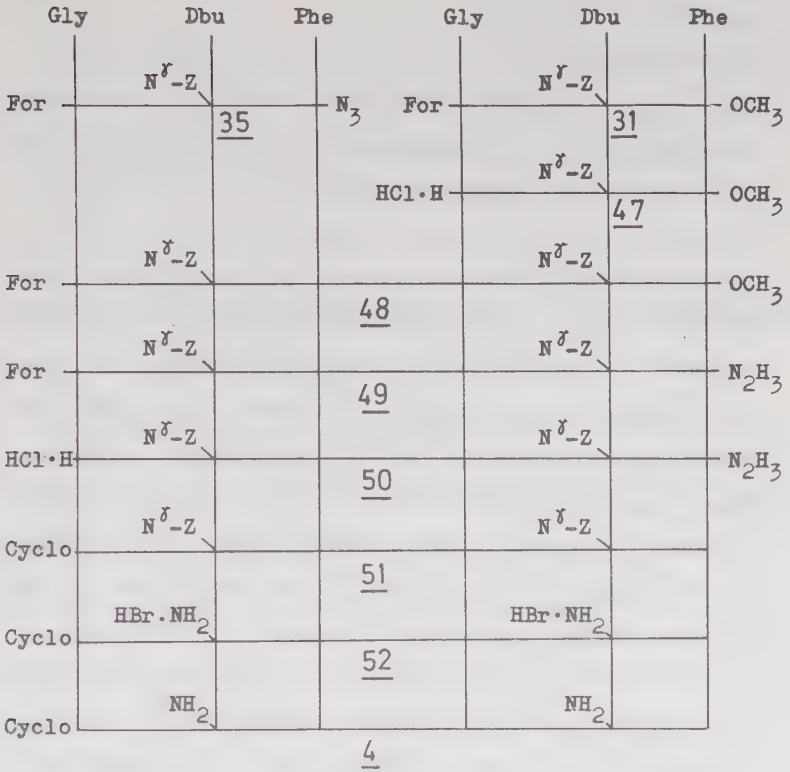
Ähnlich wie beim vorstehend beschriebenen Cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (3) wurde die Synthese des Peptides 4 geplant, um auf die Frage nach der Wasserlöslichkeit des ungeschützten Cyclopeptides mit zwei freien Aminofunktionen am Ring und des davon abgeleiteten Actinocinyl-bis-cylohexapeptides eine Antwort zu erhalten. In polaren Lösungsmitteln sollten beide Verbindungen wegen einer zusätzlichen Aminogruppe je Peptidring besser löslich sein als das Cyclopeptid 3 und dessen Actinocinylderivat.

Da die Sequenz der Verbindungen 3 und 4 sehr ähnlich ist, denn lediglich das L-Alanin in 3 ist in 4 durch L-α.γ-Diaminobuttersäure ersetzt, sollte sich die Darstellung von 4 analog der von 3 durchführen lassen. Der Plan, dementsprechend Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester (31) als Ausgangsmaterial dieser Synthese über geeignete Zwischenstufen zuerst zu dimerisieren und dann zu cyclisieren, legte die in Schema 4 wiedergegebene Reaktionsfolge nahe.

Kupplung des Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-azids (35) mit dem durch Deformylierung von 31 erhaltenen Glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid (47) lieferte das geschützte lineare Hexapeptid 48 in 75 % Ausbeute als schwerlösliche, amorphe Substanz, die man in Dimethylsulfoxid löste und durch Einwirkung von überschüssigem Hydrazinhydrat in das Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid (49) überführte. Das bei der Deformylierung von 49 in methanolischer Salzsäure erhaltene Hexapeptid-hydrazid-hydrochlorid 50 konnte, wie auch das Glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-hydrazid-hydrochlorid (45), auch nach mehrmaligem Umfällen aus Dimethylformamid/Äther nicht analysenrein erhalten werden und mußte deshalb als Rohprodukt weiterverarbeitet werden.

Zur Cyclisierung diazotierte man 50, stellte durch Verdünnen

Schema 4: Synthese des Cyclo-[glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (4)



mit Dimethylformamid/Wasser 3:1 die Konzentration des Peptides auf etwa 2 mMol/l ein und neutralisierte die zum Diazotieren zugesetzte Säure mit Triäthylamin. Die bald einsetzende Trübung des Ansatzes zeigte an, daß die Reaktion erfolgreich ablief. Nach Aufarbeitung wurde das geschützte

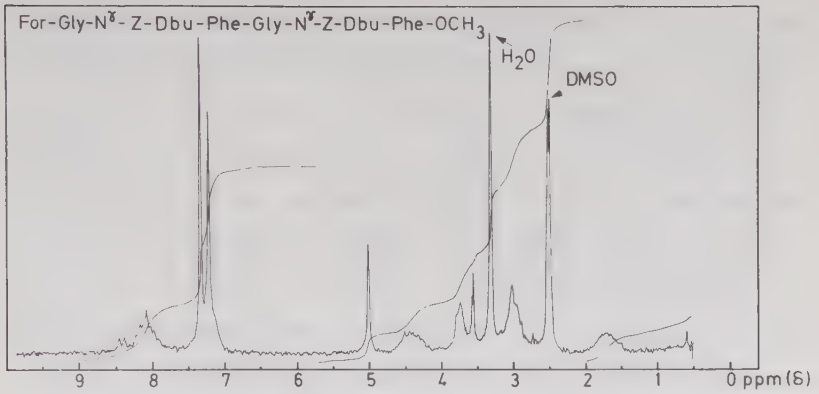
Cyclopeptid 51 mit 66 % Ausbeute erhalten.

Für die cyclische Struktur von 51 sprechen die gleichen Argumente, die bereits im Falle von 43 angeführt wurden:

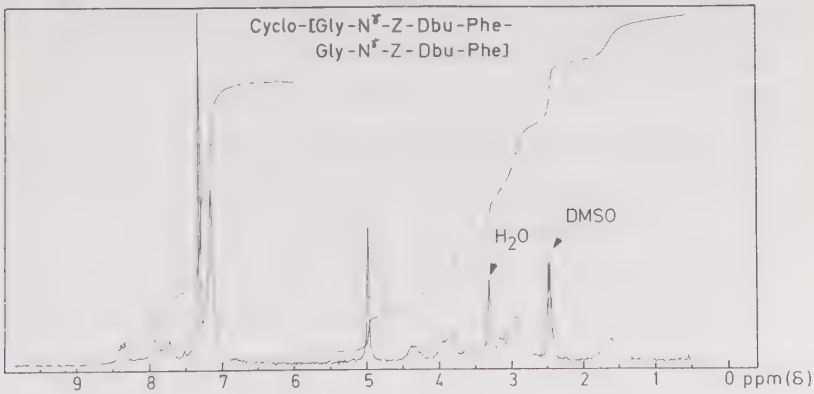
a) 51 reagiert nicht mit Ninhydrin.

b) Gegenüber den linearen Vorstufen sind Schmelzpunkt und Drehwert stark erhöht.

c) Die NMR-Spektren des linearen Formyl-hexapeptid-methylesters 48 und des Cyclopeptides 51 weisen in zwei Bereichen augenfällige Veränderungen auf. Der Methylen-Bereich der linearen Verbindung erstreckt sich von δ =2.8 bis 3.8 ppm und läßt außer dem Ester-Methoxyl bei δ =3.57 ppm zwei Arten von Protonen erkennen. Im Spektrum des Cyclopeptides ist der entsprechende Bereich signifikant verbreitert (δ =2.6 bis 4.1 ppm) und macht wenigstens vier Protonenarten unterscheidbar. Die Verbreiterung der Signale macht wie im Falle von 43 das Vorliegen eines Konformerengemisches wahrscheinlich. Der zweite Unterschied zwischen den Spektren von 48 und 51 wird bei Betrachtung der N-H-Signale deutlich. Im Spektrum von 48 ist lediglich ein Dublett der Intensität zwei bei δ =8.42 ppm (J=7 Hz) und ein breiter Bandenhaufen zwischen δ =7.6 und 8.32 ppm erkennbar. Dagegen bedingt die durch den Ringschluß hervorgerufene Ordnung der Amidprotonen im Spektrum von 51 das Auftreten je eines Dubletts der Intensität 2 bei δ =7.76 ppm (J=8 Hz) und δ =8.37 ppm (J=7 Hz) sowie eines kaum aufgelösten Tripletts der Intensität 2 bei δ =7.93 ppm (J≈5 Hz), das den Amidprotonen des Glycins zuzuordnen ist.

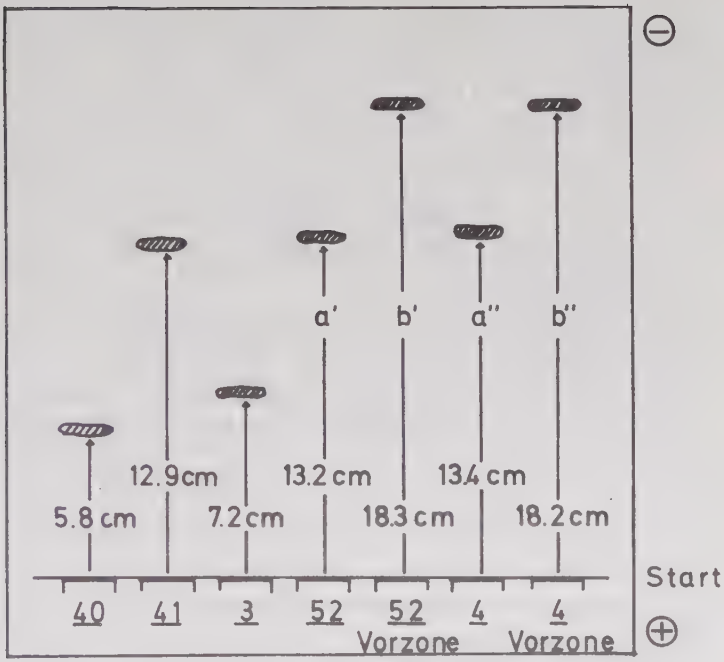


Abbild. 8: 100 MHz-Spektrum von 48 in Hexadeutero-dimethylsulfoxid



Abbild. 9: 100 MHz-Spektrum von 51 in Hexadeutero-dimethylsulfoxid

Die Frage, ob die Ringschlußreaktion das gewünschte cyclische Monomere oder Polykondensationsprodukte geliefert hatte, konnte wie bei 43 erst nach Überführung von 51 in das ungeschützte Cyclopeptid 52 bzw. dessen Base 4 beantwortet werden. Katalytische Hydrierung von 51 erwies sich dafür als undurchführbar; ob wegen der Schwerlöslichkeit oder weil die Substanz noch Spuren aus Vorstufen verschleppten Dimethylsulfoxids enthielt, muß dahingestellt bleiben. Die Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe gelang dagegen sowohl mit 33 proz. Bromwasserstoffsäure in Eisessig[53] als auch bei Anwendung von Phosphoniumjodid in Eisessig[54]. Aus dem nach der letzten Methode erhaltenen Dihydrojodid wurde durch Einwirkung von Ammoniak die freie Base 4 hergestellt. Beide Produkte, das Dihydrobromid 52 und die freie Base 4, ließen sich durch Chromatographie an Sephadex LH-20 aus Methanol reinigen. Beide Elutionsdiagramme wiesen neben den Hauptzonen je eine schneller laufende Vorzone auf, die größere Moleküle als die von 4 oder 52 enthalten mußten. Da die fraglichen Verunreinigungen positive Ninhydrin-Reaktionen zeigten, konnten sie nicht vom Ausgangsmaterial 51 herrühren. Es mußte sich dabei vielmehr entweder um Polykondensationsprodukte oder aber um eine Verbindung handeln, die noch eine Benzyloxycarbonyl-Gruppe enthielt. Aufklärung brachte ein Elektropherogramm (Abbild.10), auf dem neben den bereits früher untersuchten Substanzen 3, 40 und 41 (S. 34) die Komponenten 4, 52 und die Inhaltsstoffe der entsprechenden Vorzonen aufgetragen waren. Danach sind die Laufstrecken a' und a'' der Produkte 52 und



Abbild. 10: Elektropherogramm der Peptide 40, 41, 3, 52 und 4 sowie der Inhaltsstoffe der Vorzonen von 51 und 4.
Bedingungen: 1100 V/cm, 160 mA, 25 Min., Puffer 1.1 (Ameisensäure/Essigsäure/Wasser 15:10:75)

4 erwartungsgemäß gleich und angenähert in Übereinstimmung mit der des Linearpeptides 41. Daß die Wanderungsgeschwindigkeit von 52 bzw. 4 geringfügig weniger als um den Faktor 2 gegenüber 3 vermehrt ist, resultiert aus der Molekülver-

größerung um eine Methylenaminogruppe und ist demnach auch theoretisch erklärbar. Die sehr große Laufstrecke der Inhaltsstoffe der Vorzonen macht wahrscheinlich, daß es sich dabei um Polykondensationsprodukte des Linearpeptid-hydrazids 50 handelt, denn daß die Zonen mit den Laufstrecken a' und a", wie in Abbild. 10 angegeben, 52 bzw. 4 enthalten, konnte durch osmometrische Molekulargewichtsbestimmung sichergestellt werden.

Nachdem die Struktur 52 bzw. 4 durch Molekulargewichtsbestimmung und Cyclisierungsbeweis gesichert ist, erlaubt das vergleichende Elektropherogramm den Schluß, daß das Cyclopeptid 3 ebenfalls als Monomeres vorliegt. Dasselbe kann man wegen der völlig gleichartigen, nachfolgend beschriebenen Synthese mit großer Sicherheit für Cyclo- [glycyl-N^{γ}-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (60a) annehmen, das der Untersuchung durch die beschriebenen Methoden nicht zugänglich ist.
Dieses Peptid, das als Ausgangsmaterial für die Darstellung des entsprechenden Actinocinyl-bis-cyclohexapeptides dienen sollte, wäre im Prinzip durch Kupplung von 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoylchlorid mit Cyclo-[glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (4)erhältlich gewesen. Da jedoch beide Aminogruppen von 4 diese Reaktion eingehen können und dadurch schlechte Ausbeuten und wahrscheinlich Trennprobleme zu befürchten waren, bedeutete die Synthese einer neuen Peptidsequenz, die den 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl-Rest als Schutzgruppe enthalten sollte, die Umgehung dieser

Schwierigkeiten.

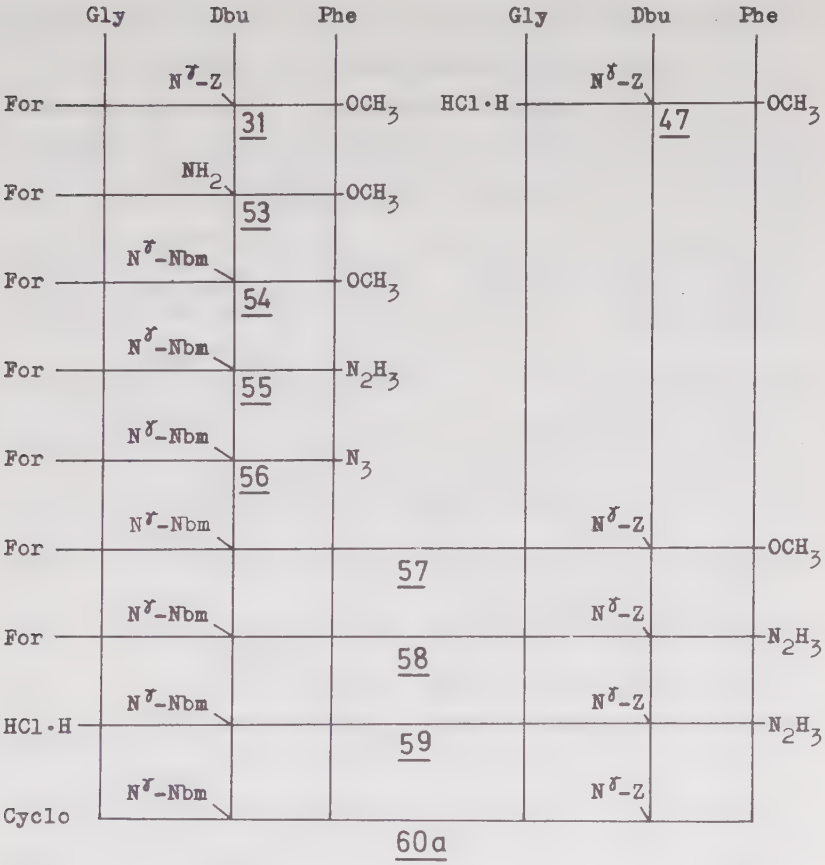
Der Versuch, diese Schutzgruppe durch Umsetzung von L-$\alpha.\gamma$-Diaminobuttersäure mit 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoylchlorid in Analogie zur Darstellung des Benzyloxycarbonyl-Derivates einzuführen, gelang zwar, aber mit zu geringer Ausbeute, als das eine Synthese, ausgehend von dieser Verbindung, sinnvoll erscheinen konnte. Der dann eingeschlagene Weg des Schutzgruppenaustausches in Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalaninmethylester 31 scheiterte zunächst daran, daß sich die Hydrierung dieser Verbindung in der von Hofmann und Mitarbeitern[51] angegebenen Weise, also in Gegenwart von Ameisensäure, nur mit unbefriedigender Ausbeute durchführen ließ. Bei der hydrogenolytischen Decarbobenzoxylierung wird üblicherweise Salzsäure zugesetzt, da sie die Reaktion selbst beschleunigen und die entstehende Aminogruppe gleichzeitig in das Hydrochlorid überführen soll. Enthält das Molekül außerdem eine Formylgruppe, verbietet sich der Mineralsäurezusatz wegen der Säurelabilität des Formylrestes. Da Carbonsäuren keine Deformylierung verursachen, aber unter Umacylierung reagieren können, hydrierten die Autoren[51] unter Zusatz von Ameisensäure. Diese kann aber gleichzeitig an verschiedenen Metallen und Metalloxiden, u.a. an Palladium, zu Kohlendioxid dehydriert werden[55,56], was letztlich bewirkt, daß die beigefügte Säure durch Zersetzung entfernt, also eine säurefreie Hydrierung durchgeführt wird. In jedem Falle führt die ständige zusätzliche Umsetzung von Ameisensäure am Kontakt zu einer vorzeitigen Ermüdung desselben.

Bemerkenswert ist, daß früher bereits versucht worden war, Ameisensäure als Wasserstoffdonator bei katalytischen Hydrierungen an Palladiumkontakten zu verwenden. Neunhoeffer und Pelz[57] berichten, daß sie bei der Umsetzung von Nitrobenzol mit Ameisensäure und Palladium in einer stürmisch verlaufenden Reaktion Anilin erhielten. Da andere Substrate sich nicht reduzieren ließen- die Autoren führen dies auf zu geringe Aktivität des Kontaktes zurück, der nach Wieland in alkalischer Lösung hergestellt worden war-, stellten sie die Versuche ein.

Vol'pin und Mitarbeiter[58] haben in neuerer Zeit das Problem wieder aufgegriffen und nachgewiesen, daß Acetylene und Olefine durch Ameisensäure und Formiat in Gegenwart von Übergangsmetallkomplexen hydriert werden können. Das ermutigte mich zu eigenen Versuchen, in deren Verlauf die Umsetzung von 1-Nitronaphthalin zu 1-Naphthylamin, von 1-Pyrennitril zu 1-Pyrenyl-methylamin und von zwei Benzyloxycarbonyl-aminosäuren zu den freien Aminosäuren gelang. Dabei wurde beobachtet, daß Palladium-Mohr wesentlich heftiger mit Ameisensäure reagiert als Palladium-Kohle[56] und bessere Hydrierungsausbeuten ergibt.

Die Verwendung von Essigsäure als saurer Katalysator bei der Hydrierung von Formyl-glycyl-N^{δ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester (31) lieferte das Decarbobenzoxyprodukt in guter Ausbeute und ohne merkliche Umacylierungsanteile. Damit erschien der folgende Syntheseplan erfolgversprechend.

Schema 5: Synthese des Cyclo-[glycyl-N$^{\gamma}$-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (60a)



Nbm = 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl-Rest

Kupplung von 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoylchlorid mit Formyl-glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester 53 in Aceton/Natriumhydrogencarbonat-Lösung ergab den Tripeptidester 54, der sich mit guter Ausbeute in das Hydrazid 55 umwandeln ließ. Man diazotierte 55 zum Azid 56 und kuppelte dieses mit Glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid 47 zum linearen Formylhexapeptid-ester 57. Daraus gewann man durch Einwirkung von Hydrazinhydrat das Hydrazid 58, das bei Umsetzung mit methanolischer Salzsäure in das Deformyl-Peptid 59 überging, das auch nach mehrmaligem Umfällen aus Methanol/Äther nicht analysenrein zu erhalten war.

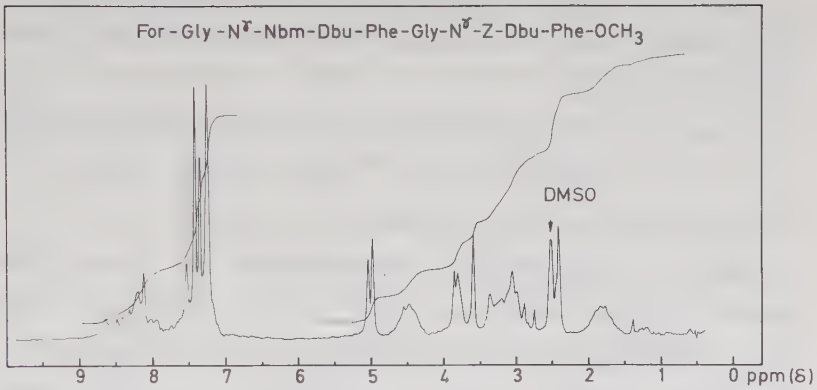
Bei Weiterverarbeitung des rohen 59 unter den üblichen Cyclisierungsbedingungen wurde das gewünschte Cyclo-[glycyl-N^{γ}-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (60a) mit der ungewöhnlich hohen Ausbeute von 75% erhalten.

Argumente für die erfolgte Cyclisierung sind wieder:

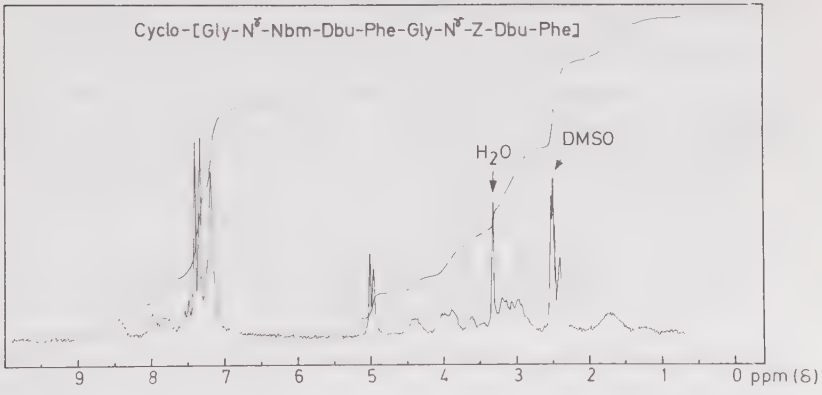
a) Ausbleiben der Ninhydrin-Reaktion

b) Merklicher Anstieg von Schmelzpunkt und Drehwert gegenüber den linearen Vorstufen.

c) Ebenso wie bei den bereits besprochenen beiden Cyclopeptiden fallen beim Vergleich der NMR-Spektren des Linearpeptids 57 und des Cyclopeptids 60a charakteristische Änderungen in zwei Frequenzbereichen auf: Die Cyclisierung und die damit verbundene Festlegung der Konformation bewirkt



Abbild.11: 100 MHz-Spektrum von 57 in Hexadeutero-dimethyl-sulfoxid



Abbild.12: 100 MHz-Spektrum von 60a in Hexadeutero-dimethyl-sulfoxid

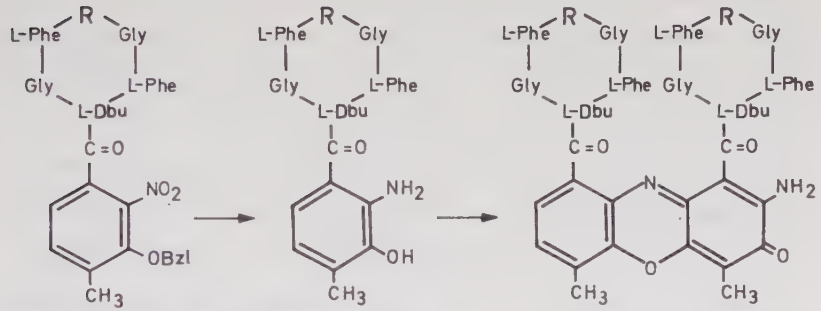
sowohl im Gebiet der Amid- als auch der Methylen-Protonen eine Verbreiterung des gesamten Absorptionsbereiches und einzelner Banden.

Der Beweis, daß wirklich das gesuchte cyclische Monomere 60a vorliegt, konnte hier nicht geführt werden, denn die massenspektrometrische Untersuchung scheiterte an nicht ausreichender Flüchtigkeit der Verbindung, die osmometrische Molekulargewichtsbestimmung an zu geringer Löslichkeit und der elektrophoretischen Untersuchung war das Peptid wegen des Fehlens polarer Gruppen nicht zugänglich. Da die einzelnen Syntheseschritte bis zum Linearpeptid und insbesondere die Cyclisierungsbedingungen denen völlig analog waren, die zur Gewinnung der Cyclopeptide 3 und 4 bzw. 52 Anwendung gefunden hatten und da das Verhalten des cyclischen Produktes, wie oben beschrieben, ebenso charakteristisch von dem der linearen Vorstufen abweicht, wie bereits bei den geschützten Cyclopeptiden 43 und 51 besprochen, kann die cyclische Monomerenstruktur auch in diesem Falle als gesichert gelten.

IV. Darstellung der Actinocinyl-bis-cyclohexapeptide

Solche Verbindungen sind prinzipiell auf verschiedenen Wegen zugänglich[5-8]. Zur Synthese der uns im Hinblick auf ihr Löslichkeitsverhalten und antibiotische Wirksamkeit interessierenden Actinocinyl-bis-cyclohexapeptide war geplant, zunächst die mit der 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure

säureamidartig verbundenen Cyclopeptide 60a bzw. 60b darzustellen. Diese sollten dann durch katalytische Hydrierung in die Derivate der 2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure 60a bzw. 60b überführt und anschließend oxidativ zu den Actinocinylpeptiden 62a bzw. 62b verkuppelt werden.



60 a : R = N$^{\gamma}$-Z-L-Dbu 61a : R = N$^{\gamma}$-Z-L-Dbu 62 a : R = N$^{\gamma}$-Z-L-Dbu

b : R = L-Ala b : R = L-Ala b : R = L-Ala

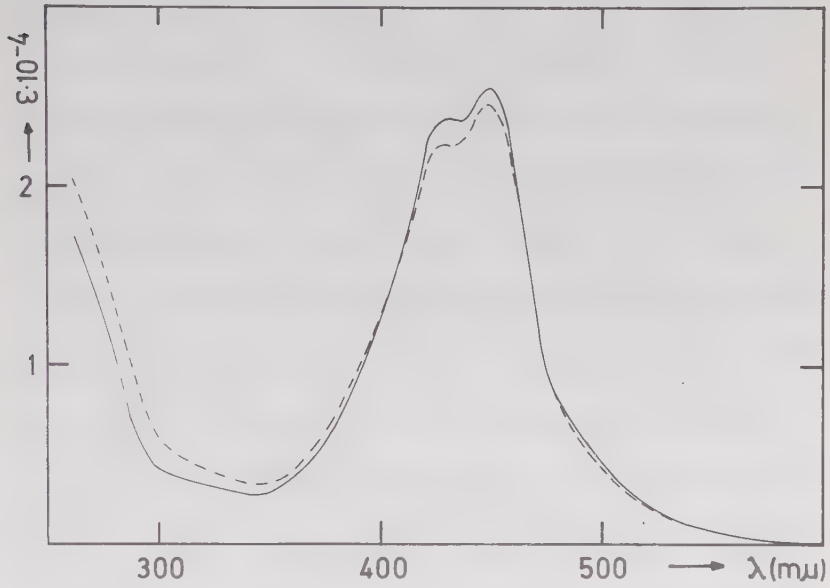
60b wurde aus Cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (3) durch Kupplung von 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoylchlorid erhalten. Nach katalytischer Hydrierung von 60b zu 61b lieferte die Oxidation von 61b mit Kaliumhexacyanoferrat-III 62b als dunkelroten, flockigen Niederschlag, der ausschließlich in Dimethylsulfoxid und deutlich weniger in Dimethylformamid löslich ist.

60a dessen Synthese im vorstehenden Kapitel beschrieben ist, ließ sich aus unbekannten Gründen nicht durch katalytische

Hydrierung in 61a überführen. Ich hoffte, daß sich die entsprechende Decarbobenzoxy-Verbindung leichter hydrieren lassen wurde und setzte 60a deshalb der Einwirkung einer Lösung von 33 proz. Bromwasserstoffsäure in Eisessig[53] aus. Das NMR-Spektrum des so erhaltenen Produktes zeigte, daß sowohl die Benzyloxycarbonyl- als auch die Benzyl-Schutzgruppe abgespalten worden war. Das Rohprodukt wurde zur Reduktion der Nitrogruppe ausgehydriert und die so hergestellte Lösung von 61a mit Kaliumhexacyanoferrat-III versetzt. Das Actinocinyl-bis-cyclohexapeptid 62a fiel aus der Reaktionslösung als braunroter, flockiger, schwerlöslicher Niederschlag aus. Chromatographie an Sephadex LH-20 aus Dimethylformamid oder an Cellulose aus verschiedenen Kresotinat-Systemen bzw. aus Butanol/Pyridin/Wasser 6:4:3 wurde versucht, brachte aber nicht den gewünschten Reinigungseffekt, da nur sehr verdünnte Substanz-Lösungen hergestellt werden konnten (im Falle der Kresotinat-Systeme ließ sich eine Säule aus 1 kg Cellulose mit maximal 80 mg Rohprodukt beladen), also eher Verunreinigungen eingeschleppt wurden.- Erschöpfende Extraktion des rohen Actinocinyl-bis-cyclohexapeptides mit Methanol im Soxhlet-Apparat zur Entfernung rotgefärbter Verunreinigungen und anschließendes Umfällen des Rückstandes aus Dimethylsulfoxid/Wasser lieferte schließlich ein befriedigend reines Präparat.

Die Intensitäten der Absorptionsmaxima von 62a und 62b im langerwelligen UV sind mit denen anderer Actinocinyl-Derivate in guter Übereinstimmung und können deshalb als Reinheitsbeweise gewertet werden. Im kurzerwelligen Bereich konnte nicht gemessen werden, da das ausschließlich als

Lösungsmittel verwendbare Dimethylsulfoxid dort bereits selbst absorbiert.



Abbild. 13 : Elektronenspektrum von 62a (- - - -) und 62b (———) in Dimethylsulfoxid

Keines der beiden Actinocinyl-Derivate zeigte im antibiotischen Test Wirksamkeit, möglicherweise weil die Komplexkonstante zwischen DNS und den Substanzen zu klein ist - eine Vermutung, die sich wegen der Schwerlöslichkeit der Verbindungen nicht nachprüfen läßt.
Bemerkenswert ist, daß 62b selbst in konz. Salzsäure nahezu unlöslich ist, d.h. eine Protonierung der Chromophoramino-

gruppe allein reicht nicht aus, um das gesamte Molekül im wäßrigen Medium löslich zu machen. 62a dagegen löst sich zwar langsam aber doch befriedigend in konz. Salzsäure mit roter Farbe auf und kann aus dieser Lösung durch Zugabe von Wasser wieder ausgefällt werden, d.h. selbst drei Ammoniumgruppen verursachen noch keine ausreichende Wasserlöslichkeit. Das überrascht insofern, als die beiden entsprechenden Cyclopeptide 3 und 4 als freie Basen in Wasser, insbesondere aber in Säure, leicht löslich sind. Sofern man für die Peptide 3 und 4 hydrophobe Wechselwirkung als Ursache ausreichender Löslichkeit annimmt, und orientierende Messungen sprechen dafür, könnte man das Fehlen dieses Effektes bei den Actinocinyl-bis-cyclohexapeptiden 62a und 62b für die Schwerlöslichkeit verantwortlich machen, denn Einstellversuche von für diese Erscheinung notwendigen Konformationen führen nicht zu überzeugenden Strukturen.
Zum Abschluß sei bemerkt, daß auch beim Rühren gekühlter Suspensionen von 62a und 62b in Wasser keine Anfärbung des Lösungsmittels beobachtet wurde.
Einschränkend kann man also feststellen, daß Substitution der Pentapeptidlactonringe nativer Actinomycine durch Cyclohexapeptide zu Produkten führt, die weder antibiotische Wirksamkeit noch einen negativen Temperaturkoeffizienten der Wasserlöslichkeit aufweisen. Darüber hinaus sind diese Komponenten äußerst schwerlöslich, sofern man nicht eine genügende Anzahl löslichkeitserhöhender polarer Gruppen durch geeignete Wahl der Aminosäuren einführt.

V. Versuche zum Nachweis der hydrophoben Wechselwirkung

Es wurde bereits erwähnt, daß es keine Möglichkeit gibt, hydrophobe Wechselwirkung direkt nachzuweisen. Da die Anwendung der für orientierende Messungen bequemen Methoden der osmometrischen Molekulargewichtsbestimmung und der Bestimmung der Oberflächenspannung genügende Wasserlöslichkeit voraussetzt, wurde zunächst die Löslichkeit von Cyclo-[glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (3) und Cyclo-[glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (4) in Wasser bestimmt. Dazu stellte ich bei verschiedenen Temperaturen gesättigte Lösungen der betreffenden Substanzen her und bestimmte ihren Gehalt gravimetrisch, indem ich Lösungsproben entnahm und diese in Schiffchen aus Aluminiumfolie im Exsikkator zur Trockne eindampfte. Da die Verbindungen stark hygroskopisch sind, ist der Meßfehler relativ groß. Dennoch wird an Tab.2 folgendes deutlich:

	2°C	11.5°C	23°C
Cyclopeptid 3	0.35	0.19	0.17
Cyclopeptid 4	17.6	17.8	20.3

Tab.2: Wasserlöslichkeit der Cyclopeptide 3 und 4 in Prozent

1. Das von Zellerhoff[18] synthetisierte Cyclo-[glycyl-L-

alanyl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] ist in Wasser praktisch unlöslich. Ersatz eines Alaninmoleküls durch L-$\alpha.\gamma$-Diaminobuttersäure macht das Cyclopeptid 3 wasserlöslich, wenn auch zu gering, um osmometrische oder Oberflächenspannungs-Messungen durchführen zu können. Überführt man 3 in das Hydrochlorid, so steigt die Wasserlöslichkeit auf 45% an.

Im Falle des Cyclopeptids 4 bewirken zwei freie Aminogruppen gute Wasserlöslichkeit der freien Base.

2. Das Cyclopeptid 3 hat einen, wenn auch wenig ausgeprägten negativen Temperaturkoeffizienten der Wasserlöslichkeit. Im weiteren Verlauf versuchte ich, Assoziation des Cyclopeptides 4 in Wasser nachzuweisen. Da 4 stark hygroskopisch ist, ließen sich Lösungen definierten Gehalts nicht durch Einwiegen herstellen. Ich bereitete deshalb Lösungen anderer Phenylalanin-haltiger Peptide, nahm ihre Elektronenspektren in Wasser auf und ermittelte die mittlere molare Extinktion der Aromat-Absorptionsmaxima bei 257 mu. Mit Hilfe dieses Wertes ließ sich aus den UV-Spektren des Peptides 4 in Wasser der Gehalt mit befriedigender Genauigkeit ermitteln. Sofern die Annahme, daß das Cyclopeptid 4 in Wasser zu Dimeren assoziiert, richtig ist, sollte man bei osmometrischen Messungen größere Molekulargewichte, also kleinere Molzahlen erwarten, als für das Monomere zutreffend. Die in Tab.3 zusammengestellten Ergebnisse weisen jedoch den entgegengesetzten Gang auf.

Das erlaubt den Schluß, daß 4 in Wasser durch das Lösungsmittel protoniert und gemäß folgender Gleichung in erheb-

C_{UV} (Mol/l)	C_{osm} (Mol/l)	$x = C_{osm} : C_{UV}$
0.09	0.16	1.77
0.045	0.087	1.93
0.018	0.037	2.05

Tab.3: Abweichung der osmometrisch bestimmten Konzentrationen C_{osm} von den wahren, UV-spektroskopisch ermittelten Konzentrationen C_{UV} verschiedener Lösungen des Cyclopeptides 4 in Wasser

lichem Maße in das entsprechende Ammoniumhydroxid übergeht:

Danach können aus 1 Mol Base maximal 3 Mol Ionen entstehen. Daß diese Annahme richtig sein muß, macht die Betrachtung des Quotienten $x = C_{osm} : C_{UV}$ deutlich, denn Verkleinerung von x mit steigender C_{UV} bedeutet, daß die Protonierung der Base mit steigender Konzentration kleiner wird. Diese Feststellung könnte zu der Annahme verleiten, man müsse die Konzentration von 4 nur genügend groß machen, um nach Ausschluß der Protonierung hydrophobe Wechselwirkung dennoch nachweisen zu können. Dieser Möglichkeit stehen jedoch zwei Schwierigkeiten im Wege:

1. Obwohl sich 4 leicht in Wasser löst, ist fraglich, ob sich genügend konzentrierte Lösungen herstellen lassen.

2. Ergebnisse osmometrischer Messungen sind nur in Konzen-

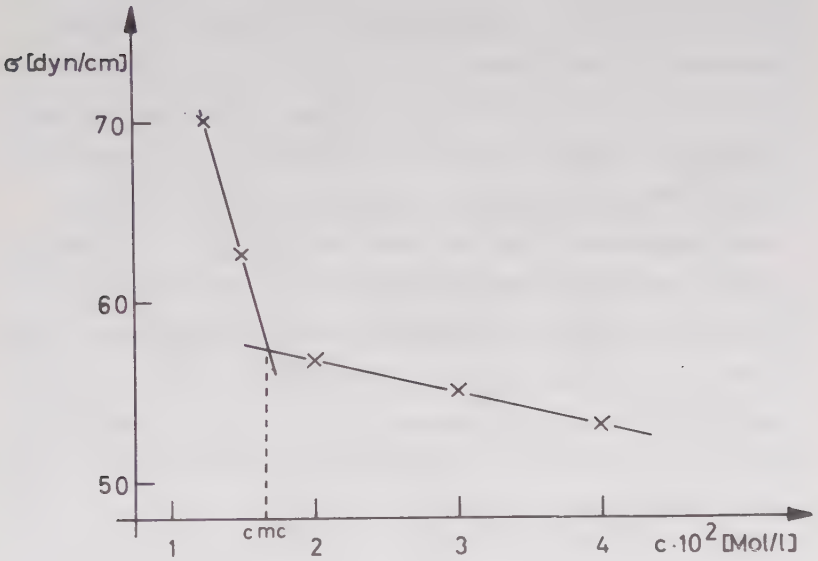
trationsintervall zwischen 0.02 und 0.5 Mol/l hinreichend genau. Um dennoch eine Aussage darüber machen zu können, ob aus 4 in wäßriger Lösung durch hydrophobe Bindungen zusammengehaltene Dimere entstehen, versuchte ich, osmometrische Messungen in 10^{-3} n Natriumhydroxid durchzuführen, denn bei pH 11 sollte die Protonierung der Base 4 weitgehend ausgeschlossen sein. Die Ergebnisse sind in Tab.4 zusammengestellt und sagen aus, daß in der am höchsten konzentrierten Lösung 84% Dimere vorliegen, bei Verdünnung um den Faktor 5 dagegen ausschließlich Monomere.

C_{UV}(Mol/l)	C_{osm}(Mol/l)	% Dimere gefunden	% Dimere berechnet für flaches bzw. gewinkeltes Modell	
0.37	0.22	84	95.8	92.7
0.19	0.12	70	94.1	89.9
0.07	0.07	0	90.8	84.5

Tab.4: Abweichung der osmometrisch ermittelten Konzentrationen C_{osm} von den wahren, UV-spektroskopisch ermittelten Konzentrationen C_{UV} verschiedener Lösungen des Cyclopeptides 4 in 10^{-3} n Natriumhydroxid

In Übereinstimmung mit diesem Befund ergibt die Bestimmung der Oberflächenspannung unterschiedlich konzentrierter Lösungen (Abbild.14) für die kritische Micellkonzentration (cmc) einen Wert zwischen $1.5 \cdot 10^{-2}$ und $2 \cdot 10^{-2}$ (Mol/l), d.h., die

Assoziation zu Dimeren setzt ein, wenn die Monomerenkonzentration den Wert $1.5 \cdot 10^{-2}$ (Mol/l) übersteigt.



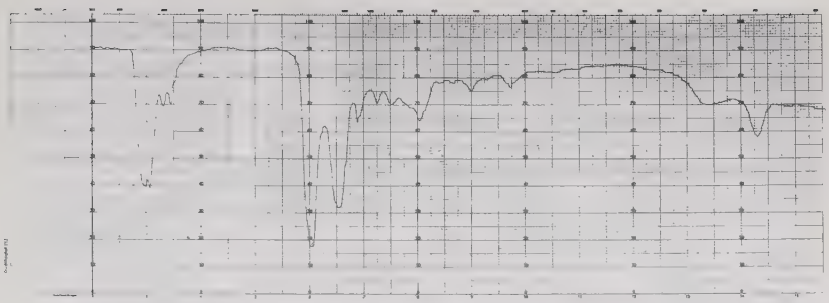
Abbild. 14: Bestimmung der cmc des Cyclopeptides 4 in Wasser bei 21°C.

Selbst wenn man unterstellt, daß die nach beiden Methoden gewonnenen Ergebnisse mit großen Meßfehlern behaftet sind, erlauben sie doch die Aussage, daß die Dimerisierung des Peptides 4 erst bei relativ hohen Konzentrationen einsetzt. Diese Feststellung steht im Widerspruch zu den für die jeweiligen Meßkonzentrationen berechneten Dimerisationsgraden für beide Assoziationsmodelle der Abbild.4 (S.15), denn

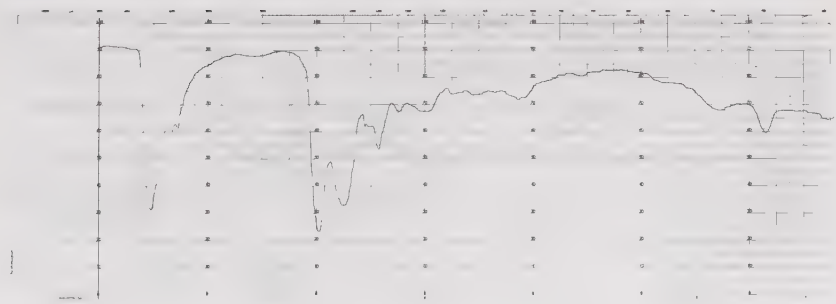
danach sollten sich Dimere noch bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen nachweisen lassen.
Diese Diskrepanz in einem so engen Konzentrationsbereich läßt sich nicht befriedigend durch die Annahme der Überlagerung anderer Effekte wie Protonierung durch das Lösungsmittel oder Wasserstoffbrückenbindungen erklären. Deshalb müssen die postulierten Assoziationsmodelle für die hydrophobe Wechselwirkung falsch gewesen sein. Dabei war ich davon ausgegangen, daß nur beim Bestehen zweier intramolekularer Wasserstoffbrücken optimale hydrophobe Wechselwirkung, verursacht durch Assoziation zweier Moleküle mit ihren beiden Phenylalanin-Resten, möglich ist. Ich hoffte, NMR-spektroskopische Untersuchungen würden die Konformationen der Peptide 3 und 4 in Lösung beweisen und damit zur Klärung des Widerspruches beitragen.

VI. Untersuchungen zur Ermittlung der Konformation der Cyclohexapeptide

Aus Denaturierungs- und Regenerations-Versuchen an Enzymen ist bekannt, daß native Peptide stets in einer Vorzugskonformation vorliegen, die in den seltesten Fällen mit der thermodynamisch günstigsten übereinstimmt. Der Grund dafür ist, daß sich der am Biosynthesezentrum kontinuierlich und mit relativ hoher Geschwindigkeit gebildete Peptidstrang bevorzugt innerhalb kleiner Bereiche der Gesamtsequenz ordnet. Im Gegensatz dazu beansprucht die Bildung synthetischer Pep-



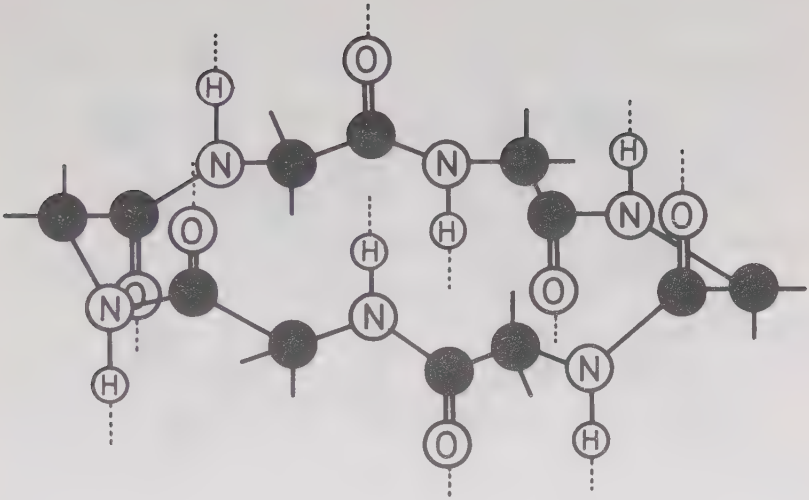
Abbild.15: IR-Spektrum (KBr) des Cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (3)



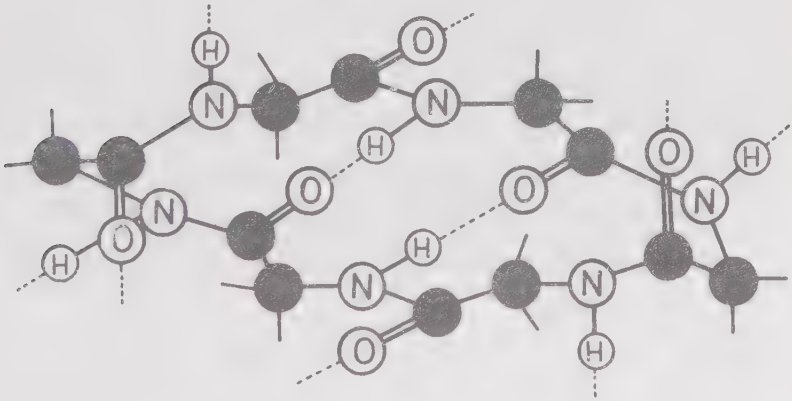
Abbild.16: IR-Spektrum (KBr) des Cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (4)

tide längere Zeiträume, und es ist deshalb möglich, wenn auch nicht zwingend, daß sich Vorzugskonformationen einstellen, die mit den thermodynamisch günstigsten identisch sind. Verschiedene Konformationen können dabei im wesentlichen durch Übergang von cis- in trans-Peptidbindungen und durch unterschiedlich begünstigte Möglichkeiten zur Wasserstoffbrückenbindung verursacht werden. Die Entscheidung, ob in einem synthetischen Peptid cis- oder trans-Amidbindungen vorliegen, kann über IR-spektroskopische Untersuchungen getroffen werden[59-61], denn trans-Amide geben sich durch intensive IR-Absorptionen im Gebiet um 1550 cm^{-1} zu erkennen, bei cis-Amiden ist diese Bande dagegen äußerst schwach oder fehlt ganz.

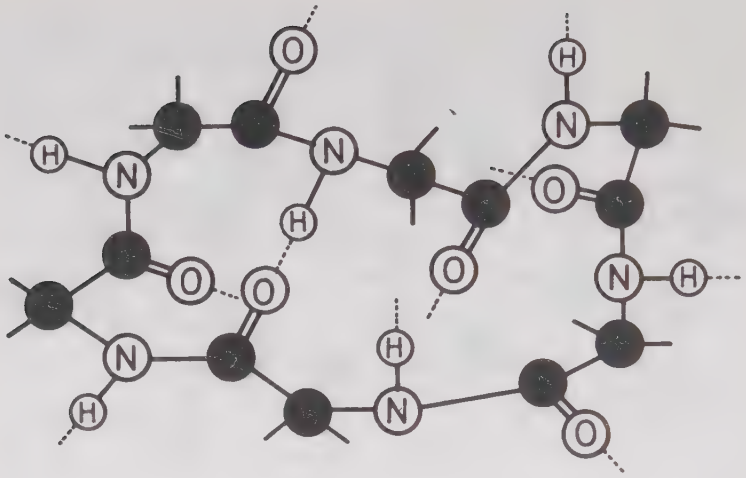
Die IR-Spektren der beiden Cyclopeptide 3 und 4 weisen bei 1525 bzw. 1540 cm^{-1} intensive Banden auf, die im Gebiet der cis-Amid-Absorptionen um 1450 bzw. 1330 cm^{-1} sind dagegen wenig ausgeprägt. Damit lassen sich analog zu bewiesenen Konformationen anderer Peptide (Übersicht[62]) drei Konformationen mit all-trans-Amidbindungen für die beiden Cyclopeptide angeben.



Abbild.17: Konformation eines Cyclohexapeptides mit ausschließlich intermolekularen Wasserstoffbrücken



Abbild.18: Konformation eines Cyclohexapeptides mit zwei intramolekularen Wasserstoffbrücken

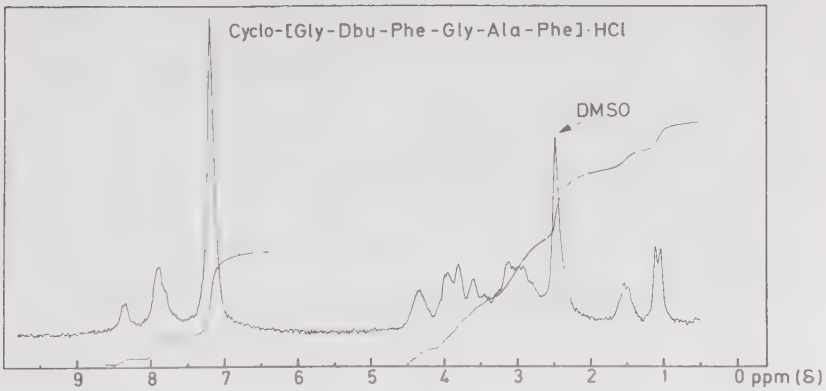


Abbild.19: Konformation eines Cyclohexapeptides mit einer intramolekularen Wasserstoffbrücke

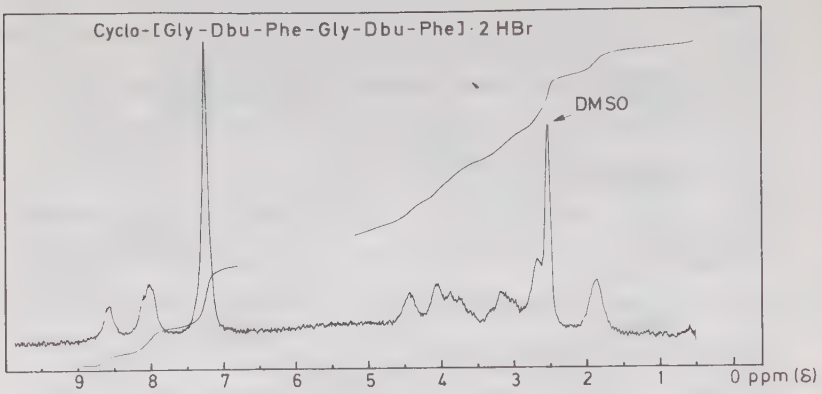
Der Nachweis, welche der drei Konformationen im Falle der Cyclopeptide 3 bzw. 4 vorliegt, sollte sich NMR-spektroskopisch führen lassen, denn die Geschwindigkeit des Deuterium-Austausches von etwa in intramolekularen Wasserstoffbrücken gebundenen Amidprotonen sollte geringer sein als die der "freien" Protonen.

Zunächst versuchte ich, die Austauschgeschwindigkeit bei den entsprechenden N-Benzyloxycarbonyl-Peptiden zu bestimmen, denn in den NMR-Spektren dieser Verbindungen (Abbild.6 und 9) waren verschiedene N-H-Protonen unterscheidbar, und man konnte hoffen, aus der Art nicht oder langsamer austauschbarer

Protonen Rückschlüsse auf die Lage intramolekularer Wasserstoffbrücken ziehen zu können. Der Versuch scheiterte daran, daß die Peptide bei Zusatz von Deuteriumoxid zu Hexadeutero-dimethylsulfoxid-Lösungen augenblicklich ausfielen. Bei Verwendung von Deuteroessigsäure anstelle von Deuteriumoxid erfolgte der Austausch aller Protonen spontan.
In den NMR-Spektren der Salze beider Peptide, Cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl -hydrochlorid](46) und Cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl]-dihydrobromid (52) sind bei Messung in Hexadeutero-dimethylsulfoxid zwei Arten von Amidprotonen unterscheidbar. Die unterschiedliche chemische Verschiebung



Abbild. 20: 100 MHz-Spektrum von 46 in Hexadeutero-dimethylsulfoxid

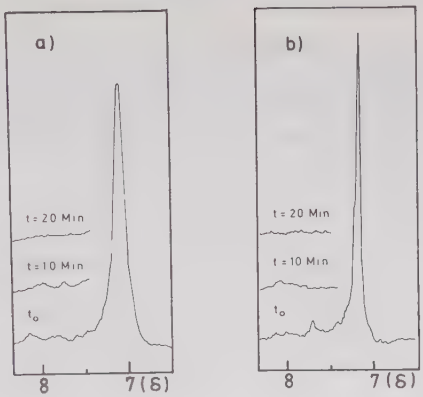


Abbild. 21: 100 MHz-Spektrum von 52 in Hexadeutero-dimethylsulfoxid

kann sowohl aminosäurespezifisch als auch darauf zurückzuführen sein, daß das Signal bei tieferem Feld von chelierten, das bei höherem Feld dagegen von unchelierten Wasserstoffatomen herrührt. Der Deuteriumaustausch ließ sich nur schlecht verfolgen, da die Auflösung der Einzelsignale nach Zusatz von Deuteriumoxid ausgesprochen mangelhaft war. Dennoch konnte man erkennen, daß die Austauschgeschwindigkeit für alle Protonen gleich war, d.h., in Dimethylsulfoxid-Lösungen sind bei den Peptiden 46 und 52 NMR-spektroskopisch keine intramolekularen Wasserstoffbrücken nachweisbar.

Die Messung in Deuteriumoxid erbrachte ebenfalls kein überzeugendes Ergebnis, denn die unmittelbar nach dem Lösen in den Spektren beider Verbindungen erkennbaren Amidwasserstoff-

Signale der Intensität < 1, waren bereits nach 20 Min. verschwunden.



Abbild. 22: Deuteriumaustausch der Amidprotonen. Ausschnitte aus 60 MHz-Spektren von 46 (a) und 52 (b) in Deuteriumoxid

Obwohl nach diesen Befunden das Bestehen intramolekularer Wasserstoffbrücken gemäß Abbild. 18 bzw. 19 nicht ausgeschlossen werden kann, sprechen sie doch eher dafür, daß die Cyclopeptide 3 und 4 in einer der Abbild. 17 entsprechenden Konformation vorliegen. Bei Annahme einer solchen Struktur lassen sich am Kalottenmodell keine Vorzugskonformationen mehr erkennen. Sicher ist nur, daß sich die Zahl der für die hydrophobe Wechselwirkung maßgeblichen C-C-Kontakte merklich verringert. Die durch Rechnung erhältlichen Dimerisationskonstanten verkleinern sich dann stark und stimmen besser mit den experimentellen Werten überein.

VII. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Durch Kombination verschiedener bekannter Verfahren wurde eine bequeme und zugleich billige Synthese für N^{γ}-Benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure (8) entwickelt.

2. Über zahlreiche bis dahin unbekannte Vorstufen gelang die Synthese der beiden wasserlöslichen Cyclopeptide Cyclo-[glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (3) und Cyclo-[glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (4) sowie der geschützten Cyclopeptide Cyclo-[glycyl-N^{γ}-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (60b) und Cyclo-[glycyl-N^{γ}-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (60a).

3. Durch katalytische Hydrierung und anschließende Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat-III wurden die Peptide 60a und 60b in die entsprechenden Actinocinyl-bis-cyclohexapeptide überführt. Diese waren weder antibiotisch wirksam, noch wasserlöslich, so daß der den nativen Actinomycinen gemeinsame negative Temperaturkoeffizient der Wasserlöslichkeit nicht nachweisbar war.

4. Bei der Bestimmung der Wasserlöslichkeit der Cyclopeptide 3 und 4 wurde für 3 ein wenig ausgeprägter negativer Temperaturkoeffizient der Wasserlöslichkeit gefunden.

5. Durch osmometrische Messungen und Bestimmung der kritischen Micellkonzentration mit der Oberflächenspannungsmethode wurde für das Cyclopeptid 4 gezeigt, daß es bei Konzentrationen oberhalb $1.5 \cdot 10^{-2}$ Mol/l, wahrscheinlich durch hydrophobe Wechselwirkung, zu Dimeren assoziiert.

6. Um den Widerspruch zwischen berechneten und gemessenen Dimerisationsgraden für das Cyclopeptid 4 in wäßriger Lösung bei verschiedenen Konzentrationen erklären zu können, wurde eine NMR-spektroskopische Konformationsuntersuchung vorgenommen, die keinen sicheren Anhaltspunkt für die Annahme intramolekularer Wasserstoffbrücken lieferte.

7. Durch vergleichende Elektrophorese konnte gezeigt werden, daß man aus der Wanderungsgeschwindigkeit von Cyclopeptiden im elektrischen Feld Rückschlüsse auf die Ringgröße der Verbindung ziehen kann, sofern Vergleichssubstanzen mit angenähert gleichem Wirkungsquerschnitt zur Verfügung stehen.

VIII. Beschreibung der Versuche

1. Allgemeines

Schmelzpunkte wurden im Berl-Block bestimmt und sind korrigiert.

Spektren: Die abgebildeten Spektren wurden mit folgenden Geräten gemessen:

NMR-Spektren: Varian HA-100 (100 MHz)
Varian A-60 (60 MHz)

IR-Spektren: Perkin-Elmer Modell 21, KBr-Preßlinge

Elektronenspektren: Beckmann DB-G

Drehwerte wurden im Polarimeter Perkin-Elmer 141 bestimmt.

Molekulargewichte wurden im Osmometer Mechrolab 301 A ermittelt.

Die Oberflächenspannung wurde mit der Kapillar-Methode bestimmt.

Hochspannungselektrophoresen wurden mit der Camag-Zelle 61000 durchgeführt.

Chromatographie: Aluminiumoxid und DC-Folien wurden von der Fa. Woelm, Eschwege, bezogen. Papierbögen für die Chromatographie (Nr. 2043 b mgl) und für die Elektrophorese (Nr. 2040 B) stammten von der Fa. Schleicher & Schüll, Einbeck.

Puffersysteme: Zur Herstellung der Actinocinyl-Derivate wurde Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7.4, bei der Elektrophorese "saurer Puffer" pH 1.1 (Ameisensäure/Essigsäure/Wasser 15:10:75) und "basischer Puffer" pH 9 (Borsäurepuffer nach Clark und Lubs) verwendet.

Ninhydrin-Sprühreagenz wurde von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

Ätherische Diazomethan-Lösung: Zu 50 g N-Tolyl-sulfonyl-N-methyl-nitrosamid (Merck) in 480 ccm Äther gab man unter Eiskühlung 24 g Kaliumhydroxid in 80 ccm Methanol. Die Reaktion wurde durch vorsichtiges Erwärmen und Umschwenken des Reaktionsgefäßes in Gang gebracht und das Diazomethan zusammen mit Äther in eine eisgekühlte Vorlage destilliert. Auf diese Weise erhielt man ca. 350 ccm einer etwa 0.4 molaren ätherischen Diazomethan-Lösung.

2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoylchlorid:
2.87 g (10 mMol) 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure wurde mit 10 ccm frisch destilliertem Thionylchlorid übergossen, die Mischung 15 Min. unter Rückfluß erhitzt und überschüssiges Thionylchlorid bei 70° i.Vak. verdampft. Beim mehrstündigen Aufbewahren des zurückbleibenden rötlichen Öls im Vakuumexsikkator über Kaliumhydroxid kristallisierte das Säurechlorid aus.

2. Darstellung von Aminosäurederivaten

Formyl-glycin-hydrazid (18)

Eine Lösung von 10.3 g (0.1 Mol) Formyl-glycin in 100 ccm Methanol wurde bis zur bleibenden Gelbfärbung mit ätherischer Diazomethan-Lösung versetzt. Nach 30 Min. fügte man einige Tropfen Eisessig hinzu, verdampfte das Lösungsmittel i. Vak., nahm das zurückbleibende Öl in 50 ccm Methanol auf und versetzte die Lösung mit 6 g (0.12 Mol) 98 proz. Hydrazinhydrat. Man ließ 3 Stdn. bei Raumtemperatur reagieren, verdampfte das Lösungsmittel i. Vak. und kristallisierte den Rückstand aus Äthanol um. Ausbeute 7.5 g (72.8 % d. Th.) Schmp. 131° (Lit.[63]: 130°).

Benzyloxycarbonyl-L-Alanin (12)

Zu einer Lösung von 81.1 g (1 Mol) L-alanin in 250 ccm 4 n Natriumhydroxid tropfte man bei -10° innerhalb einer Stunde unter Anwendung eines Vibromischers 260 ccm 4 n Natriumhydroxid und 380 ccm (ca. 1.1 Mol) einer 50 proz. Lösung von Chlorameisensäure-benzylester in Toluol. Nach einer weiteren Stunde wurde überschüssiger Chlorameisensäure-benzylester dreimal mit je 100 ccm Äther extrahiert und die Lösung mit konz. Salzsäure angesäuert. Man extrahierte dreimal mit je 100 ccm Äther, verdampfte das Lösungsmittel i. Vak. und kristallisierte den Rückstand aus Chloroform/n-Pentan um. Ausbeute 165 g (79 % d. Th.).
Schmp. 85° (Lit.[38,39] : 87°).
$[\alpha]_D^{20}$: - 14.1 ± 0.5° (c=2, Eisessig) (Lit.[18]) $[\alpha]_D^{20}$: -14.4 ± 0.1° c= 0.02, Eisessig).

Benzyloxycarbonyl-glycin (11)

Die Verbindung wurde wie Benzyloxycarbonyl-L-alanin in 80 % Ausbeute dargestellt. Schmp. 119° (Lit.[38]: 120°).

Benzyloxycarbonyl-L-alanin-methylester (17) (Veresterung mit Diazomethan)

Eine Lösung von 52.5 g (0.25 Mol) Benzyloxycarbonyl-L-alanin in 200 ccm Methanol versetzte man bis zur bleibenden Gelbfärbung mit ätherischer Diazomethan-Lösung. Nach 30 Min. setzte man einige Tropfen Eisessig zu und verdampfte das Lösungmittel i. Vak.. Der verbleibende farblose, ölige Ester wurde direkt zum Hydrazid weiterverarbeitet.

Ausbeute 54.0 g (97 % d. Th.).

Auf die gleiche Weise erhielt man:

Benzyloxycarbonyl-glycin-methylester (16)

als farbloses Öl in 98 % Ausbeute.

Benzyloxycarbonyl-L-alanin-methylester (17) (Veresterung mit Chlorsulfinsäure-methylester[40])

Zu 180 ccm Methanol tropfte man unter starkem Rühren bei -15° innerhalb 45 Min. 40 ccm Thionylchlorid, trug anschließend 97.2 g (0.485 Mol) Benzyloxycarbonyl-L-alanin ein und erwärmte mit aufgesetztem Trockenrohr 2 Stdn. auf 50°. Der nach Verdampfen des Lösungsmittels i. Vak. bei 60° mit theoretischer Ausbeute erhaltene Ester wurde direkt zum Hydrazid weiterverarbeitet.

Auf die gleiche Weise erhielt man:

Benzyloxycarbonyl-glycin-methylester (16)
als farbloses Öl in ebenfalls quantitativer Ausbeute.

N^{γ}-Benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure (8)
Eine Lösung von 14.7 g (0.1 Mol) L-Glutaminsäure in 50 ccm konz. Schwefelsäure wurde nach Überschichten mit Chloroform unter kräftigem Rühren bei Raumtemperatur innerhalb von 5 Stdn. mit insgesamt 7.8 g (0.12 Mol) festem Natriumazid in solchen Portionen versetzt, daß die Stickstoffentwicklung nicht zu heftig wurde. Nach der letzten Azidzugabe erhöhte man die Temperatur vorsichtig auf 55° und rührte weitere 6 Stdn. bei dieser Temperatur. Während des gesamten Reaktionsverlaufes ergänzte man das ständig verdampfende Chloroform so, daß stets eine 2-3 cm starke Deckschicht vorhanden war.
Zum Abstumpfen der Schwefelsäure wurde die Reaktionslösung auf 200 g zerstoßenes Eis gegossen und überschüssige Stickstoffwasserstoffsäure durch dreimalige Extraktion mit je 50 ccm Chloroform sorgfältig abgetrennt. Dann trug man in die wäßrige Phase unter Rühren portionsweise Calciumcarbonat bis zum Erreichen von pH 7 ein (ca. 200 g). Man saugte vom ausgefallenen Calciumsulfat ab, wusch den Niederschlag gründlich mit Wasser aus und konzentrierte die vereinigten Filtrate durch Eindampfen i. Vak. bei 65° auf ca. 100 ccm. Die so erhaltene Lösung wurde zur Darstellung des Kupferkomplexes der Diaminobuttersäure portionsweise mit 10 g basischem Kupfercarbonat versetzt und 2.5 Stdn. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Dann saugte man nach Zugabe

von 10 g Celite vom überschüssigen Kupfercarbonat ab und wusch den Niederschlag noch zweimal mit je 20 ccm heißem Wasser aus. Das blaue Filtrat wurde nach Abkühlung auf Raumtemperatur mit 30 g festem Natriumhydrogencarbonat versetzt. Anschließend ließ man innerhalb einer Stunde bei 0-5° (Eisbad) unter Anwendung eines Vibromischers 34 ccm einer 50 proz. Lösung von Chlorameisensäure-benzylester in Toluol dazutropfen. Dann entfernte man das Eisbad und rührte weitere 16 Stdn. bei Raumtemperatur. Der ausgefallene hellblaue Niederschlag wurde abgesaugt und solange mit Wasser, Aceton und Äther gewaschen, bis das Filtrat völlig farblos war. Nach Trocknung i. Vak. bei 70° wurden 15.9 g (54.7 % d. Th. bezogen auf L-Glutaminsäure) Kupferkomplex als hellblaues Pulver erhalten. Schmp. 236-239° (Lit.[27]: 233-236°) In eine Lösung von 15.4 g des Kupferkomplexes der N$^{\gamma}$-Benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobuttersäure in 15 ccm Methanol, 30 ccm Wasser und 12 ccm 37 proz. Salzsäure leitete man während 1.5 Stdn. unter Rühren Schwefelwasserstoff ein. Danach wurde nach Zusatz von 10 g Celite vom Kupfersulfid abgenutscht und der Niederschlag dreimal mit je 25 ccm heißem Methanol gewaschen. Man vereinigte die Filtrate, verdünnte mit Methanol auf 200 ccm und stellte mit Diäthylamin auf pH 7. Der ausgefallene amorphe, weiße Niederschlag wurde nach 2 Stdn. abgesaugt, mit Methanol und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 12.25 g (89.7 % d. Th. bezogen auf den Kupferkomplex). Schmp. 239-241° (Lit.[27]: 238-240°; Lit.[64]: 234-236°).

N^{γ}-Benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure-methylester-hydrochlorid (14)

Zu 190 ccm Methanol tropfte man unter starkem Rühren bei -15° innerhalb 45 Min. 18 ccm Thionylchlorid, trug anschließend 61.2 g (23 mMol) N^{γ}-Benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure (8) ein, erwärmte unter Rückfluß mit aufgesetztem Trockenrohr 7 Stdn. auf 50° und verdampfte das Lösungsmittel bei 50° i. Vak.. Der Rückstand wurde noch zweimal in wenig Methanol aufgenommen, die Lösung eingedampft und der Rückstand aus Methanol durch portionsweises Zugeben von Äther umkristallisiert. Ausbeute 62.5 g (89.2 % d. Th.) Schmp. 163-165° (Lit.[27]: 164-166°). $[\alpha]_D^{20}$: + 14.7 ± 0.5° (c = 2, Methanol) (Lit.[27]: $[\alpha]_D^{20}$: + 15.2° ; c = 2, Methanol).

L-Phenylalanin-methylester-hydrochlorid (10)

Zu 225 ccm Methanol tropfte man unter starkem Rühren bei -20° innerhalb 45 Min. 50 ccm Thionylchlorid, trug anschliessend 100 g (0.565 Mol) L-Phenylalanin ein, erwärmte 2 Stdn. auf 40°, verdampfte das Lösungsmittel i. Vak. und kristallisierte den Trockenrückstand aus Methanol/Äther um. Ausbeute 116.5 g (96.8 % d. Th.) Schmp. 159° (Lit.[65]: 159-161°).

3. Darstellung des Cyclo-[glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (3)

Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure-methylester (25)

Kupplung mit Dicyclohexyl-carbodiimid

Ein bei 0° bereitetes Gemisch aus 24.3 g (80 mMol) N^{γ}-Benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure-methylesterhydrochlorid, 8.25 g (80 mMol) Formyl-glycin, 8.08 g (80 mMol) Triäthylamin und 19.8 g (88 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 300 ccm Methylenchlorid wurde 3 Stdn. bei dieser Temperatur gerührt und anschließend 24 Stdn. im Kühlschrank aufbewahrt. Man saugte ausgefallenen Dicyclohexyl-harnstoff ab, wusch das Filtrat mit n Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete über Natriumsulfat und verdampfte das Lösungsmittel i. Vak.. Zur Entfernung des restlichen Dicyclohexyl-harnstoffes wurde der breiige Rückstand in wenig Aceton aufgeschlämmt, nach 2 Stdn. filtriert und das Filtrat i. Vak. eingedampft. Ausbeute 23.4 g (83.4 % d. Th.) zähes, gelbliches Öl.

$[\alpha]_D^{20}$: -18.5 ± 1° (c = 2, Methanol)

$C_{16}H_{21}N_3O_6$ (351.4) Ber. C 54.69 H 6.02 N 11.96

Gef.[x)] C 55.46 H 6.14 N 12.61

x) 20 Stdn. bei 50° im Hochvakuum getrocknet.

Im Dünnschichtchromatogramm (System Äthylacetat/Methanol 2:1) war die Substanz einheitlich bis auf sehr geringe Beimischungen von Dicyclohexyl-harnstoff, die auch für die Differenz von berechneten zu gefundenen Analysenwerten verantwortlich wäre..

Kupplung nach der Azidmethode

Eine Lösung von 5.63 g (55 mMol) Formyl-glycin-hydrazid in 110 ccm n Salzsäure und 20 ccm Eisessig wurde unter Rühren bei -10° tropfenweise mit einer Lösung von 3.79 g (55 mMol) Natriumnitrit in 30 ccm Wasser versetzt, das Azid nach 10 Min. zweimal mit je 75 ccm eiskaltem Äthylacetat extrahiert, der Extrakt mit -5° kalter ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Eiswasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, mit einem -10° kalten Gemisch aus 15.2 g (50 mMol) N^{γ}-Benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure-methylester-hydrochlorid und 5 g (50 mMol) Triäthylamin in 150 ccm Methylenchlorid vereinigt und das Reaktionsgemisch 2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Die mit n Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschene Reaktionslösung lieferte nach Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen des Lösungsmittels i. Vak. 10.4 g (59.3 % d. Th.) öligen Dipeptidester, der im Dünnschichtchromatogramm (System Äthylacetat/Methanol 2:1) mit dem nach der Carbodiimid-Methode gewonnenen identisch war.

$[\alpha]_D^{20}$: -19.3 ± 1° (c = 2, Methanol).

$C_{16}H_{21}N_3O_6$ (351.4) Ber. C 54.69 H 6.02 N 11.96

Gef.[x)] C 54.84 H 6.09 N 11.87

x) 20 Stdn. bei 50° im Hochvakuum getrocknet.

Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure-hydrazid (27)

Eine Lösung von 24.9 g (71 mMol) Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure-methylester und 5 g

(0.1 Mol) 98 proz. Hydrazinhydrat in 100 ccm Methanol ließ man 4 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Bereits nach 2 Stdn. bildeten sich in der Reaktionslösung weiße Kristallnadeln, und kurze Zeit später war das gesamte Reaktionsgemisch durchkristallisiert. Der Kristallbrei wurde abgenutscht, mit Methanol und Äther gewaschen und eine Probe zur Charakterisierung aus Methanol umkristallisiert. Die Mutterlauge wurde verworfen, da nach Eindampfen und Umkristallisieren nur sehr wenig stark verunreinigtes Produkt erhalten wurde. Ausbeute 23 g (92.3 % d. Th.). Schmp. 204°.

$[\alpha]_D^{20}$: -18.4 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{15}H_{21}N_5O_5$ (351.4) Ber. C 51.27 H 6.02 N 19.93

Gef.[x] C 51.05 H 6.04 N 19.84

x) 24 Stdn. bei 70° im Hochvakuum getrocknet.

Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-methylester (31)

Eine Lösung von 20 g (57 mMol) Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobuttersäure-hydrazid in 115 ccm n Salzsäure und 30 ccm Eisessig wurde bei -10° unter Rühren mit 4.15 g (61 mMol) Natriumnitrit in 30 ccm Wasser tropfenweise versetzt, das flockige Azid nach 10 Min. dreimal mit je 75 ccm Äthylacetat extrahiert, die vereinigten Extrakte mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Eiswasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, mit einer auf -10° vorgekühlten Lösung von 12.3 g (57.2 mMol) L-Phenylalaninmethylester-hydrochlorid und 5.8 g (57.3 mMol) Triäthylamin in 100 ccm Methylenchlorid vereinigt und 2 Tage im Kühl-

schrank aufbewahrt. Der ausgefallene amorphe, weiße Niederschlag wurde abgesaugt, mit n Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und eine Probe zur Charakterisierung aus Methanol umgefällt.

Die Aufarbeitung der Mutterlauge aus dem Reaktionsgemisch in der üblichen Weise ergab nur sehr wenig stark verunreinigtes Produkt und wurde deshalb bei späteren Ansätzen verworfen. Ausbeute 22.1 g (78.5 % d. Th.). Schmp. 179-181°.

$[\alpha]_D^{20}$: -15.8 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{25}H_{30}N_4O_7$ (498.5) Ber. C 60.23 H 6.07 N 11.24

Gef.[x] C 60.12 H 6.08 N 11.28

x) 20 Stdn. bei 70° im Hochvakuum getrocknet.

Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin (37)

Eine Suspension von 16.5 g (33 mMol) Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester in 250 ccm Dioxan, 50 ccm Aceton und 70 ccm (35 mMol) 0.05 n Natriumhydroxid wurde 1 Stde. bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandene klare Lösung verdünnte man mit Wasser auf 1 l, entfernte Neutralstoffe durch zweimaliges Extrahieren mit Chloroform und stellte mit Eisessig auf pH 3-4. Nach 12 Stdn. wurde die ausgefallene freie Säure abgesaugt und aus Methanol umgefällt. Ausbeute 13.4 g (84 % d. Th.). Schmp. 214-215°.

$[\alpha]_D^{20}$: -15.5 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{24}H_{30}N_4O_7$ (484.6) Ber. C 59.48 H 5.82 N 11.56

Gef.[x] C 59.23 H 5.81 N 11.55

x) 20 Stdn. bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid (33)

Eine Lösung von 29.5 g (59 mMol) Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester und 50 ccm 80 proz. Hydrazinhydrat in 200 ccm Dimethylsulfoxid ließ man 15 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Die Reaktionslösung wurde unter Rühren mit 800 ccm Wasser versetzt, der ausgefallene stark gequollene Niederschlag abgesaugt, aus Dimethylformamid/Wasser umgefällt und bei 80° i.Vak. getrocknet. Ausbeute 20.9 g (71 % d. Th.). Schmp. 190-191°. $[\alpha]_D^{20}$: -22.9 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{24}H_{30}N_6O_6$ (498.6) Ber. C 57.81 H 6.19 N 16.86

Gef.[x)] C 57.97 H 6.28 N 16.81

x) 48 Stdn. bei 110° im Hochvakuum getrocknet.

Benzyloxycarbonyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester (26)

Eine Lösung von 14.1 g (60 mMol) Benzyloxycarbonyl-L-alanin-hydrazid in 120 ccm n Salzsäure und 30 ccm Eisessig wurde bei -10° unter Rühren tropfenweise mit 5.0 g (72.5 mMol) Natriumnitrit in 20 ccm Wasser versetzt, das ausgefallene Azid nach 10 Min. zweimal mit je 100 ccm eiskaltem Äthylacetat extrahiert und die vereinigten Extrakte mit -5° kalter ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Eiswasser gewaschen. Nach Trocknen der Lösung über Natriumsulfat vereinigte man sie mit einem -10° kalten Gemisch von 12.9 g (60 mMol) L-Phenylalanin-methylester-hydrochlorid und 6.65 g Triäthylamin in 200 ccm Methylenchlorid und ließ 3 Tage im Kühlschrank reagieren. Dann wurde die Reaktionslösung mit

n Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel i. Vak. verdampft und der Rückstand aus Äthylacetat/n-Hexan umkristallisiert. Ausbeute 19.5 g (84 % d. Th.), weiße Nadeln. Schmp. 102° (Lit.[18]: 103°).
$[\alpha]_D^{20}$: -13.5 ± 0.5° (c = 2, Methanol) (Lit.[18]:
$[\alpha]_D^{20}$: -12.2 ± 0.2° ; c = 0.02, Methanol).

L-Alanyl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid (28)
Eine Lösung von 18.5 g (48.2 mMol) Benzyloxycarbonyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester und 4.8 ccm konz. Salzsäure in 250 ccm Methanol wurde nach Zusatz von 300 mg Palladium-Kohle 5 Stdn. mit Wasserstoff geschüttelt, währenddessen entstandenes Kohlendioxid mehrfach abgesaugt wurde. Das nach Abfiltrieren des Katalysators und Verdampfen des Lösungsmittels zurückbleibende Öl zog man nach Zusatz von etwas Methanol zu einem spröden Schaum auf, der über Phosphorpentoxid getrocknet wurde. Ausbeute 13.7 g (99.5 % d. Th.). Schmp. 154-156° (Lit.[18]: 155-158°).
$[\alpha]_D^{20}$: +12.2 ± 1° (c = 4, Methanol) (Lit.[18]:
$[\alpha]_D^{20}$: + 5.5 ± 0.1°; c = 0.04, Methanol).

Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester (32)
Eine Lösung von 10.7 g (47.8 mMol) Benzyloxycarbonyl-glycin-hydrazid in 100 ccm n Salzsäure und 17 ccm Eisessig wurde bei -10° unter Rühren tropfenweise mit einer Lösung von 4 g (58 mMol) Natriumnitrit in 15 ccm Wasser versetzt, das aus-

gefallene Azid nach 10 Min. zweimal mit je 100 ccm Äthylacetat extrahiert, der Extrakt nach Waschen mit -5° kalter ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Eiswasser und Trocknen über Natriumsulfat mit einer -10° kalten Lösung von 13.7 g (47.8 mMol) L-Alanyl-L-phenylalanin-methylesterhydrochlorid und 4.9 g (48.3 mMol) Triäthylamin in 150 ccm Methylenchlorid vereinigt und die Mischung 3 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Man wusch die Reaktionslösung mit n Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, trocknete sie über Natriumsulfat, verdampfte das Lösungsmittel i. Vak. und kristallisierte den Trockenrückstand aus Methanol um. Ausbeute 12.8 g (61 % d. Th.).
Schmp. 134-135° (Lit.[18] : 135°).
$[\alpha]_D^{20}$: -25.3 ± 0.5° (c = 2, Methanol) (Lit.[18]:
$[\alpha]_D^{20}$: -25.3 ± 0.2° ; c = 0.03, Methanol).

Glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid (34)
Eine Lösung von 12 g (27.2 mMol) Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester und 3 ccm konz. Salzsäure in 200 ccm Methanol wurde nach Zusatz von 300 mg Palladium-Kohle unter wiederholtem Absaugen entstandenen Kohlendioxids 3 Stdn. mit Wasserstoff geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Katalysators verdampfte man das Lösungsmittel i. Vak. und kristallisierte den Trockenrückstand aus Methanol/Äther um. Ausbeute 8.75 g (93.7 % d. Th.).
Schmp. 213-214° (Lit.[18] 202-203°).
$[\alpha]_D^{20}$: -12.5 ± 0.5° (c = 2, Methanol)(Lit.[18]:
$[\alpha]_D^{20}$: -13.9 ± 1° ; c = 0.033, Methanol).

$C_{15}H_{22}N_3C_4Cl$ (343.8) Ber. C 52.40 H 6.45 N 12.23
Gef.[x] C 52.37 H 6.55 N 12.23

x) 16 Stdn. bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester(38)

Kupplung mit Dicyclohexyl-carbodiimid

Eine Lösung von 8.45 g (25 mMol) Glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid und 12.5 g (25 mMol) Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester in 100 ccm Dimethylformamid versetzte man bei -10° mit 2.63 g (26 mMol) Triäthylamin und 5.67 g (27.5 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid und bewahrte die Mischung 2 Tage im Kühlschrank auf. Ausgefallener Dicyclohexyl-harnstoff wurde abfiltriert und das Filtrat zum Ausfällen des Produktes mit Äther versetzt. Man saugte den stark gequollenen weißen Niederschlag ab, fällte ihn zweimal aus Dimethylformamid/Äther um und trocknete ihn bei 70° i. Vak.. Ausbeute 9.75 g (50.5 % d. Th.). Schmp. 201-202°. $[\alpha]_D^{20}$: -31.0 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid)

$C_{39}H_{47}N_7O_{10}$ (773.8) Ber. C 60.53 H 6.12 N 12.67
Gef.[x] C 60.49 H 6.20 N 12.57

x) 24 Stdn. bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

Arbeitete man die Reaktionslösung nach Zusatz des doppelten Volumens Chloroform in üblicher Weise auf, so fielen beim Waschen Produkt und Dicyclohexyl-harnstoff im Scheidetrichter aus. Dadurch wurde eine Phasentrennung nahezu unmöglich gemacht und die Ausbeute verringerte sich. Beim anschließen-

den Trocknen mit Natriumsulfat fiel das Produkt quantitativ aus und wurde am Trockenmittel adsorbiert. Nach Auflösen des Natriumsulfats wurden 46.5° Produkt isoliert.

Kupplung nach der Azid-Methode

Eine Lösung von 10.0 g (20 mMol) Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid in 80 ccm Dimethylformamid, 15 ccm Eisessig und 45 ccm (45 mMol) n Salzsäure versetzte man bei -10° unter Rühren tropfenweise mit 1.38 g (20 mMol) Natriumnitrit in 30 ccm Wasser, vereinigte die saure Azidlösung nach 10 Min. mit einer Lösung von 6.68 g (20 mMol) Glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid in 150 ccm Dimethylformamid, stellte mit Triäthylamin auf pH 7-8 und bewahrte das Reaktionsgemisch 2 Tage im Kühlschrank auf. Das aus der Reaktionslösung durch Zugabe des vierfachen Volumens Wasser ausgefällte Produkt wurde abgesaugt, mit n Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und zur Abtrennung von Ausgangsmaterialien aus Dimethylformamid über eine kurze Säule aus neutralem Aluminiumoxid (Stufe IV) filtriert. Versetzen des Eluats mit Wasser, Absaugen des Niederschlages, Waschen mit reichlich Wasser und Trocknen bei 70° i. Vak. lieferte ein weißes, grobkörniges Produkt. Ausbeute 11.9 g (77 % d. Th.). Schmp. 203-204°). $[\alpha]_D^{20}$: -32.1 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{39}H_{47}N_7O_{10}$ (773.8) Ber. C 60.53 H 6.12 N 12.67

Gef.[x)] C 60.50 H 6.18 N 12.65

x) 24 Stdn. bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

Im Dünnschichtchromatogramm (System Äthylacetat/Methanol 2:1) war die Substanz einheitlich, ninhydrinnegativ und identisch mit der durch die Dicyclohexyl-carbodiimid-Kupplung erhaltenen.

Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin (39)

Eine Suspension von 8.7 g (11.25 mMol) Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester und 12 ccm (12 mMol) n Natriumhydroxid in 100 ccm Dioxan/Methanol 1:1 wurde 2.5 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandene noch alkalische Lösung filtrierte man von ungelösten Verunreinigungen ab, stellte das Filtrat mit Eisessig auf pH 3-4, fällte die freie Säure mit Wasser aus und reinigte das Produkt durch Umfällen aus Methanol/Wasser. Ausbeute 5.7 g (66.7 % d. Th.). Schmp. 205°.

$[\alpha]_D^{20}$: -28.7 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{38}H_{45}N_7O_{10}$ (759.8)	Ber.	C	60.07	H	5.97	N 12.91
	Gef.[x]	C	59.78	H	5.97	N 13.00

x) 24 Stdn. bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

Glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid (40)

Eine Suspension von 5.53 g (7.3 mMol) Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin in 30 ccm Metnanol wurde mit

7.5 ccm (7.5 mMol) n methanolischer Salzsäure versetzt und 20 Std. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Man verdampfte das Lösungsmittel i. Vak., fällte aus Methanol/Äther um und trocknete über Kaliumhydroxid.

Ausbeute 5.4 g (94.5 % d. Th.). Schmp. 211-213°.

$[\alpha]_D^{20}$: -42.9 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{38}H_{48}N_7O_9Cl$ (782.3)

Ber.	C	58.34	H	6.18	N	12.52	Cl	4.53	OCH_3 3.97
Gef.[x)]	C	58.45	H	6.18	N	12.54	Cl	4.53	OCH_3 3.74

x) 80 Stdn. bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

Glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-hydrochlorid (42)

Eine Suspension von 1.72 g (2.2 mMol) Glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid in 50 ccm Tetrahydrofuran/Wasser 1:1 wurde mit 5 ccm 0.05 n Natriumhydroxid versetzt und 2 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Man filtrierte die Reaktionslösung, säuerte das Filtrat mit 3 ccm n Salzsäure an, verdünnte mit Wasser auf 200 ccm, saugte den flockigen Niederschlag ab und fällte aus Methanol/Äther um. Ausbeute 1.4 g (82 % d. Th.). Schmp. 239-240°.

$[\alpha]_D^{20}$: -41.0 ± 0.5° (c = 1, Methanol).

$C_{37}H_{46}N_7O_9Cl$ (768.3)

Ber.	C	57.84	H	6.05	N	12.78	Cl	4.87	
Gef.[x)]	C	57.01	H	6.15	N	12.53	Cl	4.47	

Die gefundenen Analysenzahlen passen besser auf das Halbhydrat:

$C_{37}H_{46}N_7O_9Cl \cdot 1/2\ H_2O$ (777.3)

Ber.	C	57.17	H	6.09	N	12.65	Cl	4.56
Gef.[x]	C	57.01	H	6.15	N	12.53	Cl	4.47

[x] 60 Stdn. bei 100° im Hochvakuum getrocknet.

Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-hydrazid (44)

a) Eine Suspension von 7.74 g (10 mMol) Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester in 100 ccm Methanol wurde mit 2 g (40 mMol) 98 proz. Hydrazinhydrat versetzt und 24 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt, wobei die Suspension in eine gallertartige Masse überging. Man verdampfte das Lösungsmittel i. Vak., schlämmte den Rückstand in Wasser auf, filtrierte, wusch den Niederschlag mit Wasser und trocknete ihn. Ausbeute 13.4 g (95.8 % d. Th.). Schmp. 207-209°.

b) Eine Lösung von 7.74 g (10 mMol) Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-methylester und 5 g (0.1 Mol) 98 proz. Hydrazinhydrat in 50 ccm N-Methylpyrrolidon wurde 15 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Man versetzte die Reaktionslösung mit dem vierfachen Volumen Wasser, saugte den ausgefallenen Niederschlag ab und fällte ihn aus Dimethylsulfoxid/Wasser um. Ausbeute 7.05 g (91 % d. Th.). Schmp. 212-214°.

Da in beiden Fällen auch nach mehrmaligem Umfallen keine Übereinstimmung zwischen berechneten und gefundenen Analysen-

zahlen zu erreichen war, wurde auf die Bestimmung der optischen Drehung verzichtet.

Glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-hydrazid-hydrochlorid (45)

Eine Suspension von 7.4 g (9.45 mMol) Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-hydrazid in 75 ccm Methanol und 30 ccm n methanolischer Salzsäure rührte man 12 Stdn. bei Raumtemperatur und dann solange bei 60°, bis eine klare Lösung entstanden war (ca. 1 Std.). Man verdampfte das Lösungsmittel i. Vak. und fällte den Trockenrückstand zweimal aus Methanol/Äther um. Ausbeute 5.8 g (78.6 % d. Th.). Schmp. 182-184°.

Da auch nach mehrmaligem Umfällen keine Übereinstimmung zwischen berechneten und gefundenen Analysenzahlen zu erreichen war, wurde auf die Bestimmung der optischen Drehung verzichtet.

Cyclo-[glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (43)

Kupplung nach der Azid-Methode

Eine Lösung von 7.4 g (9.46 mMol) Glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-hydrazid-hydrochlorid in einer Mischung aus 100 ccm Dimethylformamid, 5 ccm Eisessig und 19 ccm (19 mMol) n Salzsaure wurde bei -5° unter Rühren tropfenweise mit 655 mg (9.5 mMol) Natriumnitrit in 20 ccm Wasser versetzt,

10 Min. nach der letzten Nitritzugabe in 5 l einer eiskalten Mischung aus Dimethylformamid/Wasser 2:1 gegossen, mit Triäthylamin auf pH 7-8 gestellt und 2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Die erfolgreich verlaufende Cyclisierung war dabei an der zunehmenden Trübung des Reaktionsgemisches zu erkennen. Man vervollständigte die Fällung durch Verdünnen mit dem doppelten Volumen Wasser, nutschte den Niederschlag ab, wusch ihn mit n Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, nahm ihn in Dimethylformamid auf und filtrierte die Lösung, um Ausgangsmaterial abzutrennen, über eine kurze Säule aus neutralem Aluminiumoxid (Stufe IV). Das Produkt wurde mit Wasser aus dem Eluat ausgefällt, abgenutscht und getrocknet. Ausbeute 4.3 g (63.8 % d. Th.). Schmp. 324-325°.

$[\alpha]_D^{20}$: -89.9 ±0.5° (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{37}H_{43}N_7O_8$ (713.8)	Ber.	C	62.26	H	6.07	N 13.74
	Gef.[x]	C	62.19	H	6.11	N 13.70

x) 48 Stdn. bei 140° im Hochvakuum getrocknet.

Die Substanz ist ninhydrinnegativ und liefert bei Totalhydrolyse Glycin, α.γ-Diaminobuttersäure, Phenylalanin und Alanin als chromatographisch nachweisbare Bestandteile im Ringchromatogramm (System Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1).

Kupplung mit Dicyclohexyl-carbodiimid

Eine Lösung von 1.55 g (2 mMol) Glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanin-hydrochlorid in 1 l Dimethylformamid/Wasser 1:1 wurde bei 0° mit 0.54 g (4 mMol) 1-Hydroxy-benzotriazol[66], 0.26 ccm (2 mMol) N-Äthyl-morpholin und 1.85 g Di-

cyclohexyl-carbodiimid versetzt und 3 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Man verdünnte mit Wasser auf das doppelte Volumen, saugte den ausgefallenen Niederschlag ab und wusch ihn mit n Salzsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser. Zum Entfernen des im Produkt enthaltenen Dicyclohexyl-harnstoffs wurde der Niederschlag in Chloroform aufgeschlämmt, der Brei auf eine Säule (3 x 6 cm) aus neutralem Aluminiumoxid (Stufe IV) gegeben, zum Eluieren des Harnstoffs erschöpfend mit Chloroform (Kontrolle durch Verdampfen einiger Eluat-Tropfen auf einem Uhrglas) und anschließend zur Gewinnung des Cyclopeptides mit Dimethylformamid gewaschen. Aus dieser letzten Fraktion fällte man das Cyclopeptid durch Zugabe von Wasser aus.
Ausbeute 493 mg (34.6 % d. Th.). Schmp. 308-309°.
$[\alpha]_D^{20}$: -86.5 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid).
Im Dünnschichtchromatogramm (System Äthylacetat/Methanol 2:1) war die Substanz einheitlich, ninhydrinnegativ und identisch mit der durch Azid-Kupplung gewonnenen.

Cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (3)

Eine Suspension von 4.2 g (5.9 mMol) Cyclo-[glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] in 200 ccm Eisessig und 6 ccm n Salzsäure wurde nach Zusatz je einer Spatelspitze Palladium-Mohr und Palladium-Kohle 6 Stdn. mit Wasserstoff geschüttelt, währenddessen entstandenes Kohlendioxid wiederholt abgesaugt wurde. Man filtrierte vom Katalysator ab,

dampfte das Filtrat bei 40° i. Vak. zur Trockne ein, nahm den Rückstand in wenig Wasser auf und fällte die freie Base durch Zugabe von wenig konz. Ammoniak-Lösung aus. Ausbeute 2.3 g (67.3 % d. Th.). Schmp. 268°.
$[\alpha]_D^{20}$: -95.1 ± 0.5° (c = 1, Dimethylformamid).

$C_{29}H_{37}N_7O_6$ (579.7) Ber. C 60.08 H 6.43 N 16.92
Gef.x) C 59.93 H 6.51 N 16.90

x) 24 Stdn. bei 100° im Hochvakuum getrocknet.

Die Substanz ist ninhydrinpositiv und wandert im Elektropherogramm (saurer Puffer) einheitlich als Kation.
Im Plattentest unwirksam gegen Bac. subtilis und Staph. aureus.

4. Darstellung des Cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (4)

Glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid (47)

Eine Suspension von 4.98 g (10 mMol) Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester in 50 ccm Methanol und 40 ccm n methanolischer Salzsäure wurde 16 Stdn. bei Raumtemperatur und anschließend weitere 30 Min. bei 50° gerührt. Die nun klare Lösung dampfte man i. Vak. zur Trockne ein, nahm den Rückstand in Methanol auf und fällte das Produkt mit Äther aus.
Ausbeute 4.75 g (93.7 % d. Th.). Schmp. 190-192°.
$[\alpha]_D^{20}$: -17.2 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{24}H_{31}N_4O_6Cl$ (507)

Ber.	C	56.85	H	6.16	N	11.05	Cl	6.99
Gef.[x)]	C	56.80	H	6.16	N	11.04	Cl	6.80

x) 24 Stdn. bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester (48)

Eine Lösung von 9.4 g (18.8 mMol) Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid in 100 ccm Dimethylformamid, 10 ccm Eisessig und 38 ccm n Salzsäure wurde bei -10° unter Rühren tropfenweise mit 1.31 g (19 mMol) Natriumnitrit in 25 ccm Wasser versetzt und 10 Min. nach der letzten Nitritzugabe mit einer -10° kalten Lösung von 9.55 g (18.8 mMol) Glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylesterhydrochlorid in 50 ccm Dimethylformamid vereinigt. Man stellte mit Triäthylamin auf pH 7-8 und bewahrte das Reaktionsgemisch 2 Tage im Kühlschrank auf. Das Produkt wurde durch Zusatz des doppelten Volumens Wasser aus der Reaktionslösung ausgefällt, abgesaugt, mit Wasser gewaschen, aus Dimethylformamid über eine kurze Säule aus neutralem Aluminiumoxid (Stufe IV) filtriert, aus dem Eluat mit Wasser ausgefällt, abgesaugt, mit Wasser gewaschen und bei 100° i. Vak. getrocknet.

Ausbeute 13.2 g (75 % d. Th.). Schmp. 202-203°.

$[\alpha]_D^{20}$: -5.64 ± 0.5° (c = 1.1, Dimethylsulfoxid).

$C_{48}H_{56}N_8C_{12}$ (937) Ber. C 61.52 H 6.03 N 11.96
Gef.[x] C 61.62 H 6.14 N 11.84

[x] 15 Stdn. bei 125° im Hochvakuum getrocknet.

Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α,γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α,γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid (49)

Eine Lösung von 12 g (12.8 mMol) Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α,γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α,γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester in 50 ccm Dimethylsulfoxid wurde mit 5 ccm 98 proz. Hydrazinhydrat versetzt und 6 Stdn. bei 40° aufbewahrt. Man gab die Reaktionslösung auf eine kurze Säule aus neutralem Aluminiumoxid (Stufe IV), eluierte mit Dimethylformamid, fällte das Produkt aus dem Eluat mit Wasser aus, nutschte es ab, wusch es mit Wasser und trocknete es bei 100° i. Vak. . Ausbeute 10.1 g (84.3 % d. Th.).
Schmp. 218-220°.
$[\alpha]_D^{20}$: -19.5 ± 0.5° (c = 1, Dimethylsulfoxid).
$C_{47}H_{56}N_{10}O_{11}$ (937) Ber. C 60.24 H 6.03 N 14.95
Gef.[x] C 60.41 H 6.21 N 14.96

[x] 15 Stdn. bei 125° im Hochvakuum getrocknet.

Glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α,γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α,γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid-hydrochlorid (50)

Eine Suspension von 9.37 g (10 mMol) Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α,γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-

glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid in 100 ccm Methanol und 40 ccm n methanolischer Salzsäure wurde 24 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt, wobei die anfangs körnige Suspension in eine mehr gelartige überging. Man verdampfte das Lösungsmittel i. Vak. und fällte den Rückstand aus Dimethylformamid/Äther um. Ausbeute 8.9 g (94 % d. Th.). Schmp. 212-213°.
Da auch nach mehrmaligem Umfällen keine Übereinstimmung zwischen berechneten und gefundenen Analysenzahlen zu erreichen war, wurde auf die Messung der optischen Drehung verzichtet.

Cyclo-[glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (51)

Eine Lösung von 9.45 g (10 mMol) Glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid-hydrochlorid in 100 ccm Dimethylformamid, 5 ccm Eisessig und 20 ccm n Salzsäure wurde bei -10° unter Rühren tropfenweise mit 690 mg (10 mMol) Natriumnitrit in 20 ccm Wasser versetzt. 15 Min. nach der letzten Nitritzugabe verdünnte man mit 0° kaltem Dimethylformamid/Wasser 3:1 auf 5 l, stellte mit Triäthylamin auf pH 7-8 und bewahrte das Reaktionsgemisch 2 Tage im Kühlschrank auf, wobei die erfolgreich verlaufende Cyclisierung an der schnell einsetzenden Trübung der Lösung zu erkennen war. Das Cyclopeptid wurde durch Zugabe des doppelten Volumens Wasser ausgefällt und

abgenutscht. Man gab die Lösung des Niederschlages in Dimethylsulfoxid auf eine kurze Säule aus neutralem Aluminiumoxid (Stufe IV), eluierte mit Dimethylformamid, fällte das Produkt aus dem Eluat mit Wasser aus, saugte es ab und trocknete es bei 140° i. Vak..
Ausbeute 5.78 g (65.9% d. Th.). Schmp. 279-280°.
$[\alpha]_D^{20}$: -68.3 ± 0.5° (c = 1, Dimethylsulfoxid).

$C_{46}H_{52}N_8O_{10}$ (877)	Ber.	C	62.99	H	5.97	N 12.78
	Gef.[x]	C	62.92	H	5.90	N 12.73

[x] 16 Stdn. bei 100° im Hochvakuum getrocknet.
Die Substanz ist ninhydrinnegativ und liefert bei Totalhydrolyse Glycin, α.γ-Diaminobuttersäure und Phenylalanin als chromatographisch nachweisbare Bestandteile im Ringchromatogramm (System Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1).

Cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl]-dihydrobromid (52)
Eine Suspension von 600 mg (0.685 mMol) Cyclo-[glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] in 50 ccm einer 33 proz. Lösung von Bromwasserstoffsäure in Eisessig[53] wurde 14 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Man verdampfte das Lösungsmittel i. Vak. bei 40° und chromatographierte den Trockenrückstand aus Methanol an Sephadex LH-20. Im Elutionsdiagramm waren zwei nicht sehr scharf getrennte Zonen erkennbar; eine schneller laufende Zone mit ca. 5 mg Inhaltsstoff und eine das gewünschte Produkt enthaltende Hauptzone mit 428 mg Inhaltsstoff. Die

Eluate der Hauptzone wurden i. Vak. eingedampft, der Trockenrückstand aus Methanol/Äther umgefällt und der Niederschlag abzentrifugiert. Ausbeute 428 mg (81.2 % d. Th.) Schmp. 225-230°.

$[\alpha]_D^{20}$: -88.2 ± 0.5° (c = 1, Wasser).

$C_{30}H_{42}N_8O_6Br_2$ (770.6)

Ber.	C	46.75	H	5.50	N	14.54	Br	20.74
Gef.[x)]	C	46.64	H	5.58	N	14.54	Br	20.52

x) 16 Stdn. bei 105° im Hochvakuum getrocknet.

Die Inhaltsstoffe beider Zonen sind ninhydrinpositiv und im Elektropherogramm (saurer Puffer) einheitlich. Dabei verhalten sich die Wanderungsgeschwindigkeiten der Substanzen aus Vor- und Hauptzone wie 13:8.

Das Molekulargewicht wurde osmometrisch in Wasser zu 274 bestimmt. Multiplikation mit 3, denn man kann für 52 in Wasser vollständige Dissoziation annehmen, ergibt mit 822 einen Wert, der mit dem theoretischen befriedigend übereinstimmt.

Cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (4)

Eine Suspension von 750 mg (0.855 mMol) Cyclo-[glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] in 40 ccm Eisessig wurde mit 3 g Phosphoniumjodid[54)] versetzt und mit aufgesetztem Trockenrohr 15 Min. bei 45-50° gerührt. Man verdampfte das Lösungsmittel i. Vak., nahm den Trockenrückstand in wenig Wasser auf, machte die Lösung mit

konz. Ammoniak-Lösung alkalisch, dampfte i. Vak. zur Trockne ein und chromatographierte den Rückstand aus Methanol an Sephadex LH-20. Im Elutionsdiagramm war, ähnlich wie bei der Reinigung des Dihydrobromides[52], eine Vorzone mit geringem Substanzgehalt und eine Hauptzone zu erkennen, der mehrere Zonen folgten, die die Verunreinigungen enthielten. Die Eluate der Hauptzone wurden i. Vak. eingedampft, der Rückstand aus Methanol/Äther umgefällt, der Niederschlag abzentrifugiert und getrocknet. Ausbeute 419 mg (80.7 % d. Th.). Schmp. 158-159°.

$[\alpha]_D^{20}$: -40.2 ± 0.5° (c = 1, Wasser).

$C_{30}H_{40}N_8O_6$ (608.7)	Ber.	C	59.19	H	6.62	N 18.41
	Gef.x)	C	57.89	H	6.61	N 18.01

Die Analysenzahlen passen besser auf das Halbhydrat:

$C_{30}H_{40}N_8O_6 \cdot 1/2\ H_2O$ (619.7)

Ber.	C	58.14	H	6.99	N 18.08
Gef.x)	C	57.89	H	6.61	N 18.01

x) 16 Stdn. bei 80° im Hochvakuum getrocknet.

Die Substanz ist ninhydrinpositiv und wandert im Elektropherogramm einheitlich und mit gleicher Geschwindigkeit wie das Dihydrobromid 52.

Die osmometrische Molekulargewichtsbestimmung in Methanol ergab den Wert 572.

Im Plattentest unwirksam gegen Bac. subtilis und Staph. aureus.

5. Darstellung des Cyclo-[glycyl-N^{γ}-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (60a)

Formyl-glycyl-N^{γ}-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester (54)
Eine Suspension von 4.98 g (10 mMol) Formyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester und je einer Spatelspitze Palladium-Mohr und Palladium-Kohle in 100 ccm Methanol/Eisessig 9:1 wurde 5 Stdn. unter wiederholtem Absaugen des entstandenen Kohlendioxids mit Wasserstoff geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Verdampfen des Lösungsmittel i. Vak. nahm man den Rückstand in 50 ccm Aceton auf, versetzte die Lösung mit 100 ccm m Natriumhydrogencarbonat-Lösung und tropfte unter Rühren eine Lösung von 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoylchlorid (aus 2.87 g(10 mMol) 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure und 10 ccm Thionylchlorid in üblicher Weise bereitet) in 50 ccm Aceton dazu. 20 Min. später, als die Kohlendioxid-Entwicklung beendet war, verdünnte man mit Wasser auf das dreifache Volumen, saugte den ausgefallenen Niederschlag ab und wusch ihn mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, n Salzsäure und Wasser. Zur Abtrennung polarer Verbindungen wurde aus Dimethylformamid über eine kurze Säule aus neutralem Aluminiumoxid (Stufe IV) filtriert, das Produkt aus dem Eluat mit Wasser ausgefällt, abgesaugt und getrocknet. Ausbeute 4.3 g (68 % d. Th.).

Schmp. 215-217°.

$[\alpha]_D^{20}$: -29.4 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{32}H_{35}N_5O_9$ (633.7) Ber. C 60.64 H 5.57 N 11.06

Gef.[x] C 61.01 H 5.58 N 11.07

x) 48 Stdn. bei 120° im Hochvakuum getrocknet.

Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid (55)

Eine Lösung von 5 g (7.9 mMol) Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester in 50 ccm Dimethylsulfoxid wurde mit 5 ccm 98 proz. Hydrazinhydrat versetzt und 16 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Reaktionsprodukt wurde mit dem zehnfachen Volumen Wasser ausgefällt, der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Den Trockenrückstand filtrierte man aus Dimethylformamid über eine kurze Säule aus neutralem Aluminiumoxid (Stufe IV), versetzte das Eluat mit Wasser, saugte den Niederschlag ab, wusch ihn mit Wasser und trocknete ihn.

Ausbeute 4.4 g (88 % d. Th.). Schmp. 211-212°.

$[\alpha]_D^{20}$: -11.0 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{31}H_{35}N_7O_8$ (633.7) Ber. C 58.75 H 5.56 N 15.47

Gef.[x] C 59.11 H 5.52 N 15.00

x) 48 Stdn. bei 120° im Hochvakuum getrocknet.

Formyl-glycyl-N^{γ}-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester (57)

Eine Lösung von 3.8 g (6 mMol) Formyl-glycyl-N^{γ}-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid in 25 ccm Dimethylformamid, 5 ccm Eisessig und 13 ccm n Salzsäure wurde bei -10° unter Rühren tropfenweise mit 420 mg (6 mMol) Natriumnitrit in 20 ccm Wasser versetzt, die Azid-Lösung 10 Min. nach der letzten Nitritzugabe mit einer auf 0° gekühlten Lösung von 3.04 g (6 mMol) Glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester-hydrochlorid in 50 ccm Dimethylformamid vereinigt, mit Triäthylamin auf pH 7-8 gestellt und 2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Man versetzte das Reaktionsgemisch mit dem vierfachen Volumen Wasser, nutschte den ausgefallenen Niederschlag ab, wusch ihn mit Wasser und trocknete ihn. Nach Filtration des Rohproduktes aus Dimethylformamid über eine kurze Säule aus neutralem Aluminiumoxid (Stufe IV) wurde erneut mit Wasser gefällt, der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute 4.9 g (76.2 % d. Th.). Schmp. 230-232°.

$[\alpha]_D^{20}$: $-29.5 \pm 0.5^{\circ}$ (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{55}H_{61}N_9O_{14}$ (1072.2) Ber. C 61.66 H 5.73 N 11.75

Gef.[x] C 61.68 H 5.79 N 11.74

x) 36 Stdn. bei 110° im Hochvakuum getrocknet.

Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid (58)

Eine Lösung von 9.2 g (8.57 mMol) Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-methylester und 10 ccm 98 proz. Hydrazinhydrat in 100 ccm N-Methylpyrrolidon wurde 24 Stdn. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Man ließ die Reaktionslösung unter Rühren in Äther eintropfen, saugte den ausgefallenen Niederschlag ab, wusch ihn mit Wasser und fällte aus Dimethylformamid/Wasser um. Ausbeute 8.1 g (88 % d. Th.). Schmp. 215-218° (unscharf).

$[\alpha]_D^{20}$: -38.7 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{54}H_{61}N_{11}O_{13}$ (1072.2)	Ber.	C	60.49	H	5.73	N 14.37
	Gef.[x]	C	59.61	H	5.97	N 14.39

x) 48 Stdn. bei 120° im Hochvakuum getrocknet.

Glycyl-N$^{\gamma}$-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid-hydrochlorid (59)

Eine Suspension von 4.5 g (4.2 mMol) Formyl-glycyl-N$^{\gamma}$-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid in 100 ccm Methanol und 50 ccm 2n methanolischer Salzsäure wurde 20 Stdn. bei Raumtemperatur und weitere 2 Stdn. bei 60° gerührt. Während des Erwärmens erhielt man zwischenzeitlich eine klare, leicht

gelbliche Lösung, aus der anschließend ein flockiger Niederschlag ausfiel. Die Fällung wurde durch Zusatz von Äther vervollständigt, der Niederschlag abgesaugt und mit Äther gewaschen. Ausbeute 3.8 g (85 % d. Th.).
Da auch nach mehrmaligem Umfällen aus Methanol/Äther kein analysenreines Produkt erhalten wurde, erschien die Bestimmung des Schmelzpunktes und der optischen Drehung nicht sinnvoll.

Cyclo-[glycyl-N$^{\gamma}$-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (60a)
Eine Lösung von 3.65 g (3.3 mMol) Glycyl-N$^{\gamma}$-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N$^{\gamma}$-benzyloxycarbonyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanin-hydrazid-hydrochlorid in 50 ccm Dimethylformamid, 2 ccm Eisessig und 7.5 ccm n Salzsäure wurde bei -10° unter Rühren tropfenweise mit 254 mg (3.68 mMol) Natriumnitrit in 20 ccm Wasser versetzt. 15 Min. nach der letzten Nitritzugabe wurde mit 0° kaltem Dimethylformamid/Wasser 2:1 auf 1.5 l verdünnt, mit Triäthylamin auf pH 7-8 gestellt und 2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Das nach Zusatz des doppelten Volumens Wasser ausgefallene Cyclopeptid saugte man ab und filtrierte es zur Abtrennung von Ausgangsmaterial aus N-Methylpyrrolidon über eine kurze Säule aus saurem Aluminiumoxid (Stufe IV). Das Produkt wurde aus dem Eluat mit Wasser ausgefällt, abgesaugt, mit Wasser gewaschen und bei 100° i. Vak. getrocknet. Ausbeute 2.5 g (75 % d. Th.). Schmp. 284-285°.

$[\alpha]_D^{20}$: $-55.6 \pm 0.5^\circ$ (c = 2, Dimethylsulfoxid).

$C_{53}H_{57}N_9O_{12}$ (1012.1) Ber. C 62.80 H 5.68 N 12.46

Gef.[x] C 62.69 H 5.76 N 12.44

[x] 72 Stdn. bei 100° im Hochvakuum getrocknet.

Die Substanz ist ninhydrinnegativ und liefert bei Totalhydrolyse Glycin, $\alpha.\gamma$-Diaminobuttersäure und Phenylalanin als chromatographisch nachweisbare Bestandteile im Ringchromatogramm (System Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1).

Im Plattentest unwirksam gegen Bac. subtilis und Staph. aureus.

6. Darstellung der Actinocinyl-bis-cyclohexapeptide

Cyclo-[glycyl-N$^\gamma$-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (60b)

Eine Lösung von 2.03 g (3.48 mMol) Cyclo-[glycyl-L-$\alpha.\gamma$-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] in 100 ccm Dimethylformamid und 50 ccm m Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurde bei Raumtemperatur unter Rühren tropfenweise mit einer Lösung von 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoylchlorid (aus 1 g (3.49 mMol) 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure und 3.5 ccm Thionylchlorid in üblicher Weise hergestellt) in 50 ccm Aceton versetzt. Nach einer Stunde fällte man das Produkt durch Zugabe des doppelten Volumens Wasser aus, saugte es ab, löste den Niederschlag in Dimethylformamid und filtrierte die Lösung über eine kurze Säule aus neutralem Aluminiumoxid (Stufe IV). Der beim Versetzen des Eluats mit Wasser ausgefallene Nieder-

schlag wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und bei 100° i. Vak. getrocknet. Ausbeute 2.15 g (72.7 % d. Th.). Schmp. 305-306°.

$[\alpha]_D^{20}$: -73.4 ± 0.5° (c = 2, Dimethylformamid).

$C_{44}H_{48}N_8O_{10}$ (848.9) Ber. C 62.25 H 5.71 N 13.20

Gef.[x] C 61.93 H 5.82 N 13.02

x) 48 Stdn. bei 140° im Hochvakuum getrocknet.

Actinocinyl-bis-cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] (62b)

Eine Lösung von 1.8 g (2.12 mMol) Cyclo-[glycyl-N$^{\gamma}$-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-alanyl-L-phenylalanyl] in 100 ccm N-Methylpyrrolidon wurde nach Zusatz je einer Spatelspitze Palladium-Mohr und Palladium-Kohle 6 Stdn. mit Wasserstoff geschüttelt. Man filtrierte den Katalysator ab, versetzte das Filtrat mit 50 ccm Phosphatpuffer pH 7.4 und fügte portionsweise eine Lösung von 2 g Kaliumhexacyanoferrat-III in 20 ccm Wasser hinzu. Die bereits während der Oxidation aufgetretene Fällung eines roten Niederschlages wurde nach einer Stunde durch Zugabe des doppelten Volumens Wasser vervollständigt. Da der abfiltrierte Niederschlag u. a. in Wasser, Methanol, Äthanol, Chloroform und Benzol völlig unlöslich war, wurde zur Reinigung lediglich aus Dimethylsulfoxid/Wasser umgefällt. Ausbeute 1.15 g (74.7 % d. Th.). Schmp. 337°. $[\alpha]_D^{20}$: -56.4 ± 0.5° (c = 0.5, Dimethylsulfoxid).

$C_{74}H_{82}N_{16}O_{16}$ (1451.6) Ber. C 61.23 H 5.69 N 15.44

Gef.[x] C 60.94 H 5.84 N 15.33

x) 72 Stdn. bei 130° im Hochvakuum getrocknet.

λ_{max}: 449, 429 mμ (ε: 25 450, 23 700) (Dimethylsulfoxid).
Die Probe auf 2-Desamino-actinocinyl-Derivate mit Zinn-II-chlorid und Salzsäure verlief negativ.
Auf Zusatz von 0.01 n Natriumhydroxid zu einer Lösung des Produktes in Dimethylformamid wurde eine Verfärbung nach intensiv rotviolett beobachtet.
Im Plattentest unwirksam gegen Bac. subtilis und Staph. aureus.

Actinocinyl-bis-cyclo-[glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] (62a)
Eine Suspension von 372.5 mg (0.37 mMol) Cyclo-[glycyl-N^{γ}-(2-nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl-glycyl-N^{γ}-benzyloxycarbonyl-L-α.γ-diaminobutyryl-L-phenylalanyl] in 50 ccm einer 33 proz. Lösung von Bromwasserstoffsäure in Eisessig rührte man 2 Stdn. bei Raumtemperatur. Die dabei entstandene klare, gelbgrüne Lösung wurde i. Vak. bei 30° zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 50 ccm Methanol aufgenommen und nach Zusatz je einer Spatelspitze Palladium-Mohr und Palladium-Kohle 3 Stdn. mit Wasserstoff geschüttelt. Man filtrierte den Katalysator ab, versetzte das Filtrat mit 100 ccm Phosphatpuffer pH 7.4 und gab zu dieser Lösung unter Rühren portionsweise 1 g Kaliumhexacyanoferrat-III in 50 ccm Wasser. Nach einer Stunde wurde mit Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt, der ausgefallene rote, flockige Niederschlag abzentrifugiert und aus Dimethylsulfoxid/Wasser umgefällt. Auf chromatographische Reinigung mußte wegen seiner ungenügenden Löslichkeit verzichtet werden. Dagegen konnten rote

Verunreinigungen durch Extraktion des Rohproduktes im Soxhlet'schen Extraktionsapparat mit Methanol entfernt werden. Nach nochmaligem Umfällen aus Dimethylsulfoxid/Wasser wurden 115 mg (38.5 % d. Th.) eines ziegelroten Pulvers erhalten. Schmp. 320-321°.

$[\alpha]_D^{20}$: -61.8 ± 1° (c = 0.12, Dimethylsulfoxid).

$C_{76}H_{88}N_{18}O_{16}$ (1509.7) Ber. C 60.47 H 5.87 N 16.70

Gef.[x] C 56.16 H 6.23 N 15.62

Die Analysenzahlen passen besser auf das Hexahydrat :

$C_{76}H_{88}N_{18}O_{16} \cdot 6H_2O$ (1617.8) Ber. C 56.42 H 6.23 N 15.58

Gef.[x] C 56.15 H 6.23 N 15.62

x) 24 Stdn. bei 100° im Hochvakuum getrocknet.

λ_{max}: 449, 429 mμ (ε : 24 600, 23 500)(Dimethylsulfoxid).

Im Elektropherogramm (saurer Puffer) wandert die Substanz einheitlich als Kation.

Die Probe auf 2-Desamino-actinocinyl-Derivate mit Zinn-II-chlorid und Salzsäure verlief negativ.

Auf Zusatz von 0.01 n Natriumhydroxid zu einer Lösung des Produktes in Dimethylformamid wurde eine Verfärbung nach aubergine beobachtet.

Im Plattentest unwirksam gegen Bac. subtilis und Staph. aureus.

7. Hydrierung mit Ameisensäure als Wasserstoffdonator

1-Naphthylamin aus 1-Nitronaphthalin

Eine Lösung von 2 g (11.55 mMol) 1-Nitronaphthalin in 100 ccm Ameisensäure/Methanol 1:1 wurde nach Zusatz von 400 mg Palladium-Kohle und 20 mg Palladium-Mohr 15 Stdn. bei 45°

gerührt. Dabei kommt die zu Beginn der Reaktion sehr heftige Kohlendioxidentwicklung (mit Barytwasser nachgewiesen) nach einigen Stdn. fast völlig zum Stillstand. Nach Absaugen des Katalysators verdünnte man das Filtrat mit Wasser und extrahierte Ausgangsmaterial durch mehrmaliges Ausschütteln mit Äther. Auf Zugabe von 2n Natriumhydroxid zur wäßrigen Phase wurden 465 mg (28.2 % d. Th.) 1-Naphthylamin ausgefällt. Schmp. 48-49° (Lit.[67] 50°).

1-Pyrenyl-methylamin aus 1-Pyren-nitril

Eine Suspension von 500 mg (2.2 mMol) 1-Pyren-nitril in 60 ccm Ameisensäure/Methanol 1:1 wurde 48 Stdn. bei 40° gerührt und währenddessen in Abständen von mehreren Stdn. mit insgesamt 200 mg Palladium-Mohr versetzt. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Verdampfen des Lösungsmittels i. Vak. nahm man den Rückstand in 2n Natriumhydroxid auf und extrahierte aus dieser Lösung das Amin mit Äther. Die ätherische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel i. Vak. verdampft, der Rückstand in Methanol aufgenommem und das Amin-hydrochlorid durch Einleiten von Salzsäure-Gas gefällt. Ausbeute 340 mg (58 % d. Th.). Schmp. 189-190° (Lit.[68] 191.5-192.5°).

Hydrogenolytische Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe

500 mg Benzyloxycarbonyl-L-alanin und 500 mg Benzyloxycarbonyl-glycin wurden in je 50 ccm Ameisensäure/Methanol 1:1 gegeben und die Lösungen nach Zusatz von je 50 mg Palladium-Kohle und Palladium-Mohr gerührt. In nach 2.5 Stdn. aus bei-

den Ansätzen entnommenen Proben konnten im Ringchromatogramm (System Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1) gegen Vergleichssubstanzen die ungeschützten Aminosäuren nachgewiesen werden.

Ich danke den Herren Dr. O.Pfundt und M.Beller für die Durchführung der Mikroanalysen, Fräulein E.Pietsch und Herrn U.Leonhardt für die Messung der NMR-Spektren, Frau S.Schwoerer für die Aufnahme der IR-Spektren und Frau E.v.Trotha für die Durchführung der mikrobiologischen Tests.
Besonderen Dank schulde ich Herrn Privatdozent Dr.H.Lackner für wertvolle Diskussionen und Herrn S.Uhl für sorgfältige und unermüdliche experimentelle Mitarbeit.

Für wissenschaftlichen Unterricht danke ich meinen akademischen Lehrern, den Herren Privatdozent Dr. T.Ackermann, Prof. Dr. U.Bambauer, Prof. Dr. P.Boldt, Prof. Dr. Dr.e.h. H.Brockmann, Prof. Dr. O.Glemser, Privatdozent Dr. W.Hartnagel, Prof. Dr. R.Hoppe, Prof. Dr. W.Jost, Prof. Dr. E.Kappler, Prof. Dr. W.Lüttke, Prof. Dr. F.Micheel, Prof. Dr. H.Schäfer, Prof. Dr. H.-G.v.Schnering, Prof. Dr. U.Schöllkopf, Prof. Dr. W.Seubert, Prof. Dr. G.Spiteller, Prof. Dr. F.Umland, Prof. Dr. H.Gg.Wagner, Prof. Dr. E.Wicke.

IX. Literaturverzeichnis

1) S.A.Waksman, H.B.Woodruff, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 45, 609 (1940)

2) Ch.Hackmann, Z. Krebsforsch., 58, 607 (1952)
60, 250 (1954)
Strahlentherapie 90, 296 (1953)
Med. Klin. 49, 1539 (1954)

3) G.Schulte, Z. Krebsforsch. 58, 500 (1952)
Strahlentherapie 94, 491 (1954)

4) H.Brockmann, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe (Wien) 18, 1 (1960)

5) H.Brockmann, H.Lackner, Chem. Ber. 101, 1312 (1968)

6) H.Brockmann, H.Lackner, Naturwissenschaften 47, 230 (1960); 51, 384 (1964)
48, 555 (1961)

7) H.Brockmann, H.Lackner, Chem. Ber. 100, 353 (1967)

8) H.Brockmann, H.Lackner, Chem. Ber. 101, 2231 (1968)

9) B.Hsu et. al., Scientia sinica 13, 789 (1964)

10) K.H.Schulmeyer, Diplomarbeit Univ. Göttingen (1961)

11) H.Brockmann, H.Gröne, Chem. Ber. 87, 1036 (1954)

12) H.Brockmann, G.Pampus, unveröffentlicht

13) W.Müller, Habilitationsschrift Univ. Göttingen (1967)

14) G.Némethy, H.A.Scheraga, J. phys. Chem. 66, 1773 (1962)

15) P.Witte, Dissertation Univ. Göttingen (1972)

16) Ch.Tanford, J.Amer.Chem.Soc. 84, 4240 (1962)

17) R.Schwyzer, B.Iselin, H.Rittel, P.Sieber, Helv. Chim. Acta 39, 872 (1956)

18) K.Zellerhoff, Dissertation Univ. Göttingen (1967)

19) H.D.Berndt, Dissertation Univ. Göttingen (1961)

20) R.G.Benedict, A.F.Langlykke, J. Bact. 54, 24 (1947)
P.G. Stansly, R.G.Shepherd, H.J.White, Bull. John Hopkins Hosp. 81, 43 (1947)
G.C.Ainsworth, A.M.Brown, G.Brownlee, Nature 160, 263 (1947)

21) P.Karrer, K.Escher, R.Widmer, Helv. Chim. Acta 9, 301 (1926)

22) D.W.Adamson, J. Chem. Soc. (London) 1939, 1564

23) G.Talbot, R.Gaudry, L.Berlinguet, Can. J. Chem. 36, 593 (1958)

24) M.Zaoral, J.Rudinger, Coll. czechoslov. chem. Commun. 24, 1993 (1958)

25) J.Rudinger, K.Poduška, M.Zaoral, Coll. czechoslov. chem. Commun. 25, 2022 (1960)

26) D.I.Weisblat, B.J.Magerlein, D.R.Myers, J.Amer.Chem. Soc. 75, 3630 (1953)

27) K.Vogler, P.Lanz, Helv. Chim. Acta 43, 270 (1960)

28) R.Schwyzer, P.Sieber, Helv. Chim. Acta 41, 2190 (1958)

29) M.Konishi, N.Yoshida, N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Jap. 44, 2801 (1971)

30) O.Abe, H.Takiguchi, M.Ohno, N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Jap. 40, 1945 (1967)

31) M.Ohno, N.Izumiya, Bull. Chem. Soc. Jap. 38, 1831 (1965)

32) J.C.Sheehan, W.L.Richardson, J. Amer. Chem. Soc. 76, 6329 (1954)

33) B.F. Erlanger, H.Sachs, E.Brand, J. Amer. Chem. Soc. 76, 1806 (1954)

34) J.C.Sheehan, G.P.Hess, J. Amer. Chem. Soc. 77, 1067 (1955)

35) V.duVigneaud, R.Dorfmann, H.S.Loring, J. Biol. Chem. 98, 577 (1932)

36) J.C.Sheehan, D.-D.H.Yang, J. Amer. Chem. Soc. 80, 1154 (1958)

37) J.P.Greenstein, M.Winitz, Chemistry of the amino acids, Vol. 2, 921, John Wiley and Sons Inc. New York, London 1961

38) M.Bergmann, L.Zervas, O.F.Leinert, Ber. dtsch. Chem. Ges. 65, 1192 (1932)

39) M.Hunt, V.duVigneaud, J. Biol. Chem. 124, 699 (1938)

40) M.Brenner, W.Huber, Helv. Chim. Acta 36, 1109 (1953)

41) M.Springorum, Dissertation Univ. Göttingen (1963)

42) R.O.Studer, W.Lergier, Helv. Chim. Acta 53, 929 (1970)

43) H.Arold, Liebigs Ann. Chem. 739, 194 (1970)

44) L.M.Litvinenko, Yu.A.Sharanin, W.W.Kosmynin, L.P.Dridzh, Dokl. Akad. Nauk SSSR Ser. Khim. 200, 847 (1971)

45) Th.Wieland, K.W.Ohly, Liebigs Ann. Chem. 605, 179 (1957)

46) S.G.Waley, J.Watson, Biochem. J. 57, 529 (1954)

47) G.Losse, W.Zönnchen, Liebigs Ann. Chem. 636, 140 (1960)

48) R.Geiger, W.Siedel, Chem. Ber. 101, 3386 (1968)

49) G.Losse, N.Nadolski, J. prakt. Chem. [4] 84, 118 (1964)

50) A.Hillmann, G.Hillmann, Z. Naturforsch. 6b, 340 (1951)

51) K.Hofmann, E.Stutz, G.Spühler, H.Yajima, E.T.Schwartz, J. Amer. Chem. Soc. 87, 611 (1965)

52) G.Wendt, Ber. dtsch. Chem. Ges. 75, 425 (1942)

53) D.Ben-Ishai, J. org. Chem. 19, 62 (1954)

54) C.R.Harrington, T.H.Mead, Biochem. J. 29, 1602 (1935)

55) G.M. Schwab, Handbuch der Katalyse, Band 6, 206, Springer-Verlag, Wien 1942

56) H.Wieland, Ber. dtsch. Chem. Ges. 45, 679 (1912)

57) O.Neunhoeffer, W.Pelz, Ber. dtsch. Chem. Ges. 72, 433 (1939)

58) M.E.Vol'pin, V.P.Kukolev, V.O.Shernyshev, I.S.Kolomnikov Tetrahedron Letters (London) 1971, 4435

59) R.Huisgen, H.Brade, H.Walz, J.Glogger, Chem. Ber. 90, 1437 (1957)

60) K.Bláha, J.Smolíkova, A.Vítek, Coll. czechoslov. chem. Commun. 31, 4296 (1966)

61) L.Mladenova-Orlinova, K.Bláha, J.Rudinger, Coll. czechoslov. chem. Commun. 32, 4070 (1967)

62) C.H.Hassall, W.A.Thomas, Chem. in Britain 7, 145 (1971)

63) F.E.King, J.W.Clark-Lewis, D.A.A.Kidd, G.R.Smith, J. Chem. Soc. (London) 1954, 1039

64) M.Zaoral, J.Rudinger, F.Sǒrm, Chem. Listy 47, 427 (1953) Chem. Abstr. 49, 179 (1955)

65) H.Schwarz, F.M.Bumpus, J.Page, J. Amer. Chem. Soc. 79, 5697 (1957)

66) W.König, R.Geiger, Chem. Ber. 103, 788 (1970) 103, 2024 (1970)

67) Chemiker-Kalender 1966, 304

68) E.Marcus, J.T.Fitzpatrick, J. org. Chem. 25, 199 (1959)

Lebenslauf

Am 24.4.1942 wurde ich als Sohn des Ingenieurs für Vermessungstechnik Eberhard Opitz und dessen Ehefrau Katharina, geb. Meißner, in Samter/Wartheland geboren.
Infolge der Vertreibung aus den Ostgebieten kamen wir im Frühjahr 1947 nach Göttingen. Dort besuchte ich von 1948 bis 1953 die Volksschule, von 1953 bis 1955 die Mittelschule und ab 1955 das Felix-Klein-Gymnasium, an dem ich 1962 das Reifezeugnis erhielt.
Im Anschluß an meine zweijährige Wehrdienstzeit begann ich im Wintersemester 1964 an der Westfälischen-Wilhelms-Universität Münster das Studium der Chemie und bestand dort im Sommersemester 1967 das Diplom-Vorexamen. Zum Wintersemester 1967 immatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität Göttingen, schloß zunächst die Grundpraktika ab und fertigte dann vom September 1968 bis August 1969 am Organisch-Chemischen Institut der Universität unter Leitung von Prof. Dr. Dr.e.h. H.Brockmann meine Diplomarbeit mit dem Thema: "Katalytische Hydrierung von Hydroxynaphthochinonen und Hydroxy-anthrachinonen" an.
Seitdem arbeitete ich, ebenfalls unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr.e.h. H.Brockmann, an der vorliegenden Dissertation.